



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudio del efecto neuroprotector de los propóleos producidos en Colombia

Diana Yamile Gallego Villa

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Bogotá, Colombia
2012

Estudio del efecto neuroprotector de los propóleos producidos en Colombia

Diana Yamile Gallego Villa

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Salud Animal

Director:

DMV. Ph.D. Camilo Alberto Orozco Sanabria

Codirectora

Lic Mic. MSc. Judith Figueroa Ramírez

Línea de Investigación:

Microbiología y Epidemiología

Grupo de Investigación:

Productos de la colmena

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

Bogotá, Colombia

2012

Lema

*La alegría de ver y entender es el más perfecto don
de la naturaleza.*

Albert Einstein

Agradecimientos

A Dios por haberme permitido cosechar un logro más en mi vida, al Doctor Camilo Alberto Orozco, por su tutoría y apoyo incondicional a lo largo de este proceso de formación; a la Doctora Judith Figueroa, por su codirección y sus grandes aportes; a los integrantes de los grupos de investigación en Microbiología y Epidemiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, por haber apoyado el desarrollo técnico del presente trabajo. A mi familia, y mis amigos, por su cariño y apoyo incondicional. Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia, Alma Máter de mi formación profesional.

Finalmente, un especial agradecimiento al Doctor Gonzalo Arboleda Bustos, y su grupo de Investigación en Neurociencias y Muerte Neuronal, cuya participación e invaluable colaboración, permitieron en gran parte, la ejecución y culminación de este trabajo.

Resumen

El término neurodegeneración denota la pérdida neuronal patológica, característica de desórdenes neurodegenerativos como la Enfermedad de Alzheimer (EA) y la Enfermedad de Parkinson (EP). Recientemente, se ha sugerido que el estrés oxidativo podría estar relacionado de forma directa con la muerte neuronal patológica de estas enfermedades, ya que el aumento de radicales libres es capaz de generar alteraciones membranales y del citoesqueleto, junto con activación de caspasas y proteasas activadoras de vías de muerte neuronal. En este sentido, el desarrollo de terapias naturales con capacidad antioxidante, dirigidas al manejo de desórdenes neurodegenerativos, ha permitido la identificación de diversas sustancias con capacidad neuroprotectora. Una de tales sustancias es el propóleo cuyo alto contenido de polifenoles le proveen una gran capacidad antioxidante y posiblemente neuroprotectora. Para conocer el potencial neuroprotector de los propóleos colombianos, se estandarizaron concentraciones letales entre 40-60% de H_2O_2 y KCl, en células de neuroblastoma humano SHSY-5Y ($1\mu M$ y 25mM respectivamente). Posteriormente, concentraciones crecientes de 26 muestras de propóleos, fueron desafiadas ante la acción de los citotóxicos durante 24h. Como control positivo se empleó una muestra comercial de propóleo verde de Brasil. La viabilidad celular fue determinada por los métodos de tinción de MTT y LDH. Los resultados sugieren que los propóleos colombianos, al igual que el propóleo verde de Brasil, no presentan un efecto neuroprotector significativo, en un modelo de estudio *in vitro* empleando peróxido de hidrogeno y cloruro de potasio como citotóxicos ($p \geq 0.05$).

Palabras clave: Antioxidantes, Estrés Oxidativo, Neurodegeneración, Neuroprotección, Propóleos Colombianos.

Abstract

The neurodegeneration denotes pathological neuronal loss and is characteristic of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD). Recently, it has been suggested that oxidative stress may be directly associated with the pathological neuronal death of these conditions, because the increase of free radicals is capable of generating membrane and cytoskeletal alterations, activation of caspases and activating proteases neuronal death pathways. In this sense, the development of antioxidant therapies directed to managing neurodegenerative disorders, has allowed identification of various natural substances with neuroprotective capacity. One such substance is propolis, whose high content of polyphenols will provide a high capacity and potentially neuroprotective antioxidant.

For the neuroprotective potential of Colombian propolis, were standardized lethal concentrations of H₂O₂ 40-60% KCl and in human neuroblastoma cells SHSY-5Y (1 μ M and 25 mM respectively). Subsequently, increasing concentrations of 26 samples of propolis were challenged with the cytotoxic action of prooxidant during 24h. A commercial sample of Brazilian Green Propolis was used by positive control of neuroprotection. Cell viability was determined by MTT staining methods and LDH. The results suggest that the propolis Colombians, like the green propolis from Brazil do not present a significant neuroprotective effect in an *in vitro* model study using hydrogen peroxide and potassium chloride as cytotoxic ($p \geq 0.05$).

Keywords: Antioxidants, Oxidative stress, Neurodegeneration, Neuroprotection, Colombian Propolis.

Contenido

	Pág.
RESUMEN.....	IX
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABLAS	16
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	17
INTRODUCCIÓN	18
1. REVISIÓN DE LITERATURA	22
1.1 Las Enfermedades Neurodegenerativas.....	23
1.2 Enfermedad de Alzheimer	23
1.3 Enfermedad de Parkinson	25
1.4 Síndrome de Disfunción Cognitiva de perros geriátricos	27
1.5 Muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas	29
1.5.1 Alteraciones en la homeostasis del Ca ²⁺ intracelular	30
1.5.2 Estrés Oxidativo	32
1.6 Alternativas Terapéuticas	33
1.6.1 Propóleo como producto nutracéutico	34
2. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA MORTALIDAD INDUCIDA POR H₂O₂ Y KCL EN CÉLULAS SHSY-5Y	44
2.1 Resumen.....	44
2.2 Introducción	45
2.3 Materiales y métodos	48
2.3.1 Reactivos	48
2.3.2 Mantenimiento de la línea celular SHSY-5Y	48
2.3.3 Exposición a H ₂ O ₂	49

2.3.4	Exposición a KCl	49
2.3.5	Determinación de la viabilidad celular	49
2.3.6.	Análisis Estadístico	50
2.4	Resultados	50
2.5	Discusión	52
2.6	Conclusión	54

3. ESTUDIO DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LOS PROPÓLEOS PRODUCIDOS EN COLOMBIA. 65

3.1	Resumen	65
3.2	Introducción	66
3.3	Materiales y Métodos	71
3.3.1	Reactivos.....	71
3.3.2	Muestras de propóleos.....	71
3.3.3	Mantenimiento de la línea celular SHSY-5Y.	72
3.3.4	Adición de las muestras de propóleos	73
3.3.5	Tratamientos con H ₂ O ₂ y KCl	74
3.3.6	Determinación de la viabilidad celular	74
3.3.7	Análisis Estadístico	75
3.4	Resultados	75
3.4.1	Efecto de propóleos colombianos ante neurotoxicidad inducida por H ₂ O ₂	75
3.4.2	Efecto de propóleos colombianos frente neurotoxicidad inducida por KCl.....	76
3.4.3	Evaluación de la viabilidad celular utilizando el método de cuantificación de liberación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	77
3.4.4	Comparación propóleos colombianos con propóleo verde de Brasil... ..	77
3.5	Discusión	78
3.6	Conclusiones	84

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 102

4.1	Discusión y conclusiones	102
4.2	Recomendaciones	105

ANEXO A: SÍNTOMAS Y LESIONES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER...	106
--	------------

ANEXO B: FACTORES ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. ...	107
--	------------

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1. Células SHSY-5Y expuestas a concentraciones crecientes de H_2O_2	57
Figura 2-2. Células SHSY-5Y expuestas a concentraciones crecientes de KCl.....	57
Figura 2-3. Viabilidad de células SHSY-5Y expuestas a H_2O_2	58
Figura 2-4. Viabilidad de células SHSY-5Y expuestas a KCl	58
Figura 3-1. Reacción MTT.	86
Figura 3-2. Evaluación de supervivencia en células expuestas a propóleos boyacenses al 96% y H_2O_2	87
Figura 3-3. Evaluación de supervivencia en células expuestas a propóleos del Valle del Cauca al 96% y H_2O_2	87
Figura 3-4. Evaluación de supervivencia en células expuestas a propóleos de la Sierra Nevada de Santa Marta al 96% y H_2O_2	88
Figura 3-5. Evaluación de la viabilidad en células expuestas a KCl y propóleos boyacenses al 70%.....	88
Figura 3-6. Evaluación de la viabilidad en células expuestas a KCl y propóleos al 70% del Valle de Cauca.....	89
Figura 3-7. Evaluación de la viabilidad en células expuestas a KCl y propóleos al 70% de la Sierra Nevada de Santa Marta.	89
Figura 3-8. Evaluación de la viabilidad en células expuestas a KCl y propóleos al 96% del Altiplano Cundiboyacense.	90
Figura 3-9. Evaluación de la viabilidad en células expuestas a KCl y propóleos al 96% del Valle del Cauca.	90
Figura 3-11. Evaluación de la viabilidad con MTT, en células SHSY-5Y expuestas a KCl y muestras N° 104 y 146 de propóleos Cundiboyacenses.	91
Figura 3-10. Evaluación de la viabilidad en células expuestas a KCl y propóleos al 96% de la Sierra Nevada de Santa Marta.	91

Figura 3-12. Evaluación de la citotoxicidad con LDH en células SHSY-5Y expuestas a propóleos Cundiboyacenses y KCl.	92
Figura 3-13. Células SHSY-5Y expuestas a 25mM de KCl y propóleo verde de Brasil...	93
Figura 3-14. Comparación de SHSY-5Y expuestas a 25mM de KCl junto con propóleos 104, 146 o propóleo verde de Brasil.	93

Lista de tablas

Pág.

Tabla I. Concentraciones de H_2O_2 seleccionadas para disminuir la viabilidad celular entre un 40-60% en la línea celular SHSY-5Y	56
Tabla II. Efecto de los propóleos del Altiplano Cundiboyacense, sobre la viabilidad de células SHSY-5Y expuestas a H_2O_2	85
Tabla III. Efecto de los propóleos del Valle del Cauca sobre la viabilidad de células SHSY-5Y expuestas a H_2O_2	85
Tabla IV. Efecto de los propóleos de la Sierra Nevada de Santa Marta sobre la viabilidad de células SHSY-5Y expuestas a H_2O_2	86

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>AO</i>	Antioxidante
<i>EO</i>	Estrés Oxidativo
<i>EA</i>	Enfermedad de Alzheimer
<i>EP</i>	Enfermedad de Parkinson
<i>EN</i>	Enfermedades Neurodegenerativas
<i>SDC</i>	Síndrome de Disfunción Cognitiva de perros senior
βA	Péptido beta-amiloide

Introducción

A través de los tiempos, varios de los desarrollos tecnológicos, científicos y sociales de la humanidad, han permitido practicar estilos de vida que buscan aumentar la longevidad de las poblaciones. Este incremento se puede evidenciar en los índices crecientes de esperanza de vida en una gran parte de países alrededor del mundo, incluyendo Colombia, donde la proporción de personas de la tercera edad, aumenta con mayor rapidez en comparación con cualquier otro grupo de edad [1].

El aumento en la esperanza de vida se relaciona de manera directa con la susceptibilidad frente al desarrollo de enfermedades de tipo neurodegenerativo, como la EA y la EP que se caracterizan por presentar los mayores índices de incidencia y prevalencia a nivel mundial [2- 4]. La EA es una enfermedad de evolución lenta y provoca pérdida progresiva de la memoria, la orientación, el juicio y el lenguaje [2]; por su parte, la EP puede definirse como un desorden neurodegenerativo que provoca una marcada incapacidad de movimientos incluyendo tremor, bradiquinesia, alteraciones de la locomoción y el balance, alteraciones cognitivas, entre otras [5].

Además de provocar un serio detrimento sobre la salud humana, las neuropatías asociadas al proceso de envejecimiento también pueden afectar a otras especies, por ejemplo, los caninos de edad avanzada pueden desarrollar una enfermedad similar a la EA, conocida como Síndrome de Disfunción Cognitiva del perro (SDC) o “el Alzheimer del perro” [6, 7], la cual ha sido propuesta como modelo de investigación para la EA en humanos [8].

A pesar de que los aspectos etiológicos, clínicos y fisiopatológicos de estas enfermedades son parcialmente conocidos, se ha sugerido que el estrés oxidativo puede desempeñar un papel crítico en la muerte neuronal patológica característica de estas neuropatías [9-11]. En este sentido, es importante considerar el papel que pueden poseer

algunas sustancias antioxidantes sobre los mecanismos de oxidación relacionados con el desarrollo de enfermedades como la EA y la EP [12-16].

Una de las sustancias antioxidantes de origen natural que ha sido estudiada por sus potenciales aplicaciones como agente neuroprotector, es el propóleo cuyo alto contenido de polifenoles, le atribuye una gran capacidad antioxidante [17]. No obstante, esta propiedad parece estar determinada por la materia prima botánica disponible en cada área geográfica [18], y debido a esto, el origen botánico de dichos productos, podría ser el responsable del efecto antioxidante atribuido en menor o mayor medida a los productos derivados de las abejas [19].

En este sentido, el objetivo principal de este trabajo de investigación fue la evaluación *in vitro* de la posible capacidad neuroprotectora de propóleos producidos en Colombia. Para esto, se diseñaron dos modelos de citotoxicidad empleando células SHSY-5Y indiferenciadas, expuestas a H₂O₂ o KCl por un periodo de 24 horas. La viabilidad celular fue determinada por el método de tinción de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT). Los resultados indicaron que con concentraciones de 1μM y 25mM de H₂O₂ y KCl respectivamente, se obtiene un porcentaje de muerte celular entre el 40-60% de células SHSY-5Y indiferenciadas. Una vez estandarizados los modelos de muerte celular, se procedió a evaluar la capacidad citoprotectora de los propóleos colombianos. Para esto, se emplearon 26 muestras de propóleos obtenidos de 3 diferentes zonas geográficas: Altiplano Cundiboyacense, Valle del Cauca, y Sierra Nevada de Santa Marta. Estas muestras fueron diluidas en etanol al 70% y al 96%, y posteriormente, concentraciones crecientes de cada una de las muestras (50μg-1pg) fueron adicionadas a los modelos de citotoxicidad por H₂O₂ y KCl. Después de 24 horas de exposición, la viabilidad celular se determinó por el método de tinción MTT, y los resultados indicaron que los propóleos de las regiones seleccionadas, no presentaron un efecto protector significativo ($p \geq 0.05$) en células SHSY-SY indiferenciadas y expuestas a H₂O₂ y KCl.

No obstante, se observó que dentro del grupo de propóleos de origen Cundiboyacense, dos de las muestras presentaron una leve disminución de la lesión celular inducida por los citotóxicos, en comparación con el control de muerte por KCl. Estos cambios mínimos fueron observados a concentraciones de 100ng, 100pg, 1pg, por lo cual, se realizó una re-evaluación de estas concentraciones de propóleos, evaluando el porcentaje de muerte

celular mediante la técnica de cuantificación de liberación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH), la cual se caracteriza por ser una prueba de mayor especificidad, en comparación con la prueba MTT. Adicionalmente, una muestra comercial de propóleo verde de Brasil fue empleada como control positivo de neuroprotección, teniendo en cuenta los reportes previos sobre su capacidad protectora en la línea neuronal PC12 [17].

Los resultados obtenidos a partir de la prueba de cuantificación de LDH indicaron que los propóleos de origen Cundiboyacense, al igual que el propóleo verde de Brasil, no presentan diferencias significativas en comparación con los controles de muerte celular inducida por KCl, en la línea celular SHSY-5Y indiferenciada ($p \geq 0.05$).

La ausencia de efecto citoprotector de propóleos colombianos en células SHSY-5Y expuestas a citotóxicos como H_2O_2 y KCl, podría ser atribuida a diversos factores asociados a la naturaleza composicional de las muestras, o a las condiciones experimentales empleadas en el desarrollo de este estudio. Sin embargo, es importante considerar que pueden existir varias alternativas en el abordaje de las propiedades de los propóleos en el manejo de enfermedades neurodegenerativas como la EA y la EP, no obstante, el desarrollo de estudios enfocados al conocimiento de estas propiedades en propóleos colombianos, es aún escaso.

A pesar de haberse identificado cierta capacidad antioxidante en la gran mayoría de propóleos de todo el mundo, la capacidad neuroprotectora solo se ha identificado en el propóleo verde de Brasil, lo que podría indicar una relación directa entre el origen geográfico y la acción citoprotectora de cada propóleo.

Probablemente por lo anterior, se puede sugerir que el desarrollo de estudios de investigación enfocados a caracterizar las propiedades nutraceuticas de los propóleos colombianos, podría otorgar a los productos apícolas nacionales, un valor agregado del que se beneficiaría el sector productor; como en el caso del propóleo verde del Brasil, cuya descripción y divulgación científicas, le ha hecho acreedor de un importante valor agregado.

En conclusión, los resultados del presente trabajo de investigación no proporcionan indicios sobre un posible efecto neuroprotector de las muestras estudiadas, no obstante,

esta investigación presenta los primeros datos de experimentación *in vitro* empleando propóleos de origen colombiano, con el objeto de dar inicio a un proceso de validación científica sobre el uso de los propóleos colombianos, como herramienta terapéutica en el manejo de neuropatías como la EA y la EP.

Capítulo 1. Revisión de Literatura

El abordaje de un tema tan complejo como el de las EN y la búsqueda de su posible prevención o tratamiento con el uso de sustancias nutraceuticas, requiere un marco de referencia amplio que permita identificar la relación existente entre los mecanismos coligados a la muerte celular observada en neuronas de pacientes afectados por desórdenes neurodegenerativos asociados al proceso de envejecimiento (EA, EP, SDC), y los diferentes blancos terapéuticos que pueden ser utilizados por la acción antioxidante de productos de origen animal con características nutraceuticas como lo es el propóleo.

Para contextualizar esta temática se hace inicialmente una descripción de la principales características anatomopatológicas y moleculares de la EA, EP y el SDC. Posteriormente se presenta una revisión detallada sobre mecanismos substanciales asociados al desarrollo de muerte neuronal en estas enfermedades, esto con el objeto de analizar los efectos deletéreos sobre los cuales pueden ejercer su acción las bondades antioxidantes de los propóleos. Este tema dará paso a la descripción de los aspectos farmacológicos concernientes a la búsqueda actual de terapias efectivas que brinden protección y/o reversión de los efectos causados por las EN.

Finalmente se describen las principales características físico-químicas de los propóleos y se profundiza en los efectos de sus propiedades citoprotectoras frente a diversos escenarios de neurodegeneración. Así, esta revisión describe aspectos fundamentales y de validez científica en temáticas de gran importancia frente al uso de sustancias nutraceuticas de origen animal, que permitan mitigar o prevenir el padecimiento de EN como EA y EP.

1.1 Las Enfermedades Neurodegenerativas

El término neurodegeneración denota la muerte neuronal patológica característica de enfermedades como la EA y la EP [1]. Este proceso neurodegenerativo puede afectar a otras especies, por ejemplo, caninos de edad avanzada que desarrollan una neuropatología similar a la EA, conocida como Síndrome de Disfunción Cognitiva de perros senior (SDC) o “Alzheimer del perro”, por su parecido con esta enfermedad [2].

Dentro del grupo de las EN, la EP y la EA se llevan por mucho el interés de los investigadores, debido a que estas son consideradas como enfermedades complejas, devastadoras e incurables, representando la tercera causa de muerte mundial, después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer [3, 4]. No obstante, la problemática que representan estas patologías, también incluye un importante impacto económico, pues el costo estimado a nivel mundial para demencias como la EA, fue de 604 billones de dólares en 2010, y el 70% de este gasto se presenta en zonas como el Oeste de Europa y Norte América [5]. Con respecto a otros países industrializados, se calcula que el costo alcanza aproximadamente 1.2 billones de dólares por año [6].

Por ello, comprender el origen, el proceso y el porqué de la susceptibilidad de ciertos sujetos a padecer este tipo de enfermedades, representa un objetivo primordial para las investigaciones en este campo. Tal interés científico, ha permitido en los últimos 15 años, lograr adelantos importantes en áreas como la genética, la bioquímica y la epidemiología, todo esto, con el objetivo de disminuir la incidencia de los síndromes neurodegenerativos demenciales. No obstante, la ausencia actual de tratamientos totalmente efectivos, hace resaltar la necesidad por encontrar nuevas alternativas terapéuticas que puedan prevenir este tipo de enfermedades.

1.2 Enfermedad de Alzheimer

Siendo la más común de las enfermedades neurodegenerativas y dada la heterogeneidad de sus cuadros etiológicos, patológicos y clínicos, la EA suele considerarse como el paradigma de los procesos neurodegenerativos que se relacionan con el proceso de envejecimiento. En términos generales, esta neuropatía de tipo progresivo se caracteriza por inducir el desarrollo de síntomas distintivos originados por lesiones histopatológicas cerebrales específicas (Anexo A) [7].

De acuerdo con algunos reportes, esta patología se manifiesta inicialmente en el lóbulo temporal, en la zona del giro dentado del hipocampo, lo que se ha relacionado con problemas de memoria a corto plazo; posteriormente afecta el lóbulo parietal, lesionando así, procesos de visualización espacial o del conocimiento de hábitos y usos; y finalmente al lóbulo frontal, que puede dar lugar a problemas de comportamiento [8].

El paulatino deterioro de las funciones cognitivas e intelectuales provoca en el paciente la pérdida de su autonomía y ocasionalmente ansiedad, irritabilidad, depresión o alucinaciones; tales condiciones requieren cuidados y atenciones especiales que crean una situación familiar devastadora, con el consiguiente deterioro de la calidad de vida no sólo del paciente, sino también de sus cuidadores. De ahí la imperiosa necesidad de encontrar tratamientos que palien las consecuencias de esta enfermedad [9]. En este sentido, existen varios factores de riesgo y protectores relacionados con la EA (Anexo B) que han sido utilizados para hacer recomendaciones prácticas, breves y concretas a los pacientes, o a diferentes personas en riesgo, para eliminar los factores de riesgo y promover los de protección [7].

Las lesiones histopatológicas de la EA incluyen pérdida de sinapsis y neuronas, deficiencia de neurotransmisores, agregación de placas extracelulares de oligómeros de β A, y formación de placas neurofibrilares compuestas en su mayoría por proteína Tau hiperfosforilada [10].

Los oligómeros de β A están conformados por los residuos 40 y 42 de péptidos β A (β A40, β A42), generados a partir de la acción de dos proteasas (β - y γ -secretasas), sobre la Proteína Precursora de Amiloide (APP). El β A42 juega un papel crítico en la patogénesis de la EA, debido a que su poder neurotóxico le confiere la capacidad de formar agregados de manera extensiva [12, 13]. Así mismo, algunas evidencias sugieren que el ensamble oligomérico del β A puede ser el factor desencadenante del déficit de memoria y la sinaptotoxicidad [14], ya que las placas maduras carecen de toxicidad, y al parecer, sirven como almacenamiento del ensamble tóxico de β A [13, 15].

No obstante, algunos estudios han sugerido que la presencia de depósitos de placas amiloideas, inclusive en cantidades substanciales, no es un factor suficiente para generar síntomas de demencia por sí solo, y además, es probable que las anormalidades en los

biomarcadores de deposición de β A, precedan los signos asociados al decline clínico y cognitivo [16-18].

Por otro, lado, se ha argumentado que los cambios neurofibrilares de la proteína Tau, siguen una vía típica de acumulación que corresponde con los síntomas clínicos, por lo cual, las alteraciones patológicas relacionadas con cambios de la proteína Tau, han sido consideradas por algunos, como uno de los factores determinantes de la enfermedad [11].

La EA es de preocupación mundial y se tiene como la primera causa de deterioro mental en Estados Unidos y Canadá, además de ser la cuarta causa de mortalidad en la población de edad avanzada en estos países. En México, según registros, la padecen 430.000 personas, y si bien afecta primordialmente a los adultos mayores, se han detectado casos entre los 35 y 50 años de edad. Es la enfermedad más frecuente de las demencias irreversibles y se proyecta un aumento en el índice de incidencia en ancianos, hasta llegar a afectar al 20% de la población mayor de 80 años. En este sentido, es evidente que la EA representa un grave problema de salud pública y presumiblemente ha de ser una de las patologías más relevantes para el siglo XXI en el mundo occidental [9].

1.3 Enfermedad de Parkinson

La EP se caracteriza clínicamente por su inicio focal, afectando principalmente las extremidades de formas diversas. Entre estas lesiones se encuentran el temblor de reposo, la lentitud en la realización de actividades manuales, la hipofonía, los espasmos distónicos, y otros síntomas sensitivos como dolor o parestesias en un miembro, o trastornos del estado de ánimo. El proceso neurodegenerativo que caracteriza a la EP progresa lentamente, por ejemplo, se ha calculado un empeoramiento en unos cinco puntos por año, en la Escala Unificada de valoración clínica de esta enfermedad (UPDRS=Unified Parkinson Disease Rating Scale) [19].

Desde una perspectiva clínica, la EP se inicia como consecuencia de un déficit dopaminérgico relativamente focal, responsable de los síntomas iniciales y su generalización. Este proceso podría resumirse en una pérdida progresiva en la síntesis y disponibilidad de dopamina, cifrada en un 60% al inicio de la enfermedad, llegando hasta

un 95% en los estadios finales. En ocasiones, el carácter progresivo de la EP también se manifiesta con la aparición de fluctuaciones motoras y disquinesias en respuesta al tratamiento farmacológico, con la resultante dificultad para establecer un equilibrio terapéutico, además, al cabo de 5-10 años de evolución de la enfermedad, sin disposición de un tratamiento efectivo, es posible observar la aparición de otras manifestaciones neurológicas, entre las que destacan los trastornos de la marcha con desequilibrio, hipofonía y ronquera, sialorrea, estado depresivo, deterioro cognitivo, etc. Adicionalmente, en etapas tardías de la enfermedad se presentan alteraciones cognitivas y complicaciones psiquiátricas, en forma de estado de confusión, alucinaciones y delirio, prácticamente siempre asociadas a los fármacos dopaminérgicos [19].

Los cerebros de individuos afectados con EP, presentan marcada degeneración y pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, neuronas colinérgicas y norepinefinérgicas del cerebro basal anterior, neuronas serotoninérgicas del cerebro medio, además de neuronas de la médula espinal y del sistema autónomo periférico [20], donde la lesión sobre varios de estos sistemas, contribuye en gran parte a las manifestaciones no motoras de la enfermedad [21].

En la actualidad existen un gran número de factores etiopatogénicos relacionados con la aparición de la EP, y entre estos se destacan: el envejecimiento, susceptibilidad genética, disfunción mitocondrial, alteraciones de la glía y su capacidad neuroprotectora, aumento del estrés oxidativo, aumento en la formación de productos glicosilados terminales, excitotoxicidad y tóxicos ambientales como herbicidas o pesticidas. Poder establecer cuáles de estos y otros muchos factores y mecanismos son primarios al inicio de la enfermedad o secundarios al proceso de muerte neuronal, es un reto de máxima actualidad, importancia y urgencia [19, 22].

Esta enfermedad afecta alrededor de 1 millón de personas en los Estados Unidos y cerca de 5 millones alrededor del mundo, además, algunos datos reportan que cerca del 1% de la población con 60 años o más, y aproximadamente el 4% de la población mayor de 80 años, resultan afectados y dada la creciente población de ancianos en los Estados Unidos, se estima que el número de individuos con EP se duplicará para el año 2030 [16].

1.4 Síndrome de Disfunción Cognitiva de Perros Geriátricos

A lo largo de su vida geriátrica los perros al igual que los humanos, son más vulnerables a padecer diferentes tipos de síndromes demenciales neurodegenerativos de carácter progresivo [23, 24].

El SDC o “Alzheimer del perro” es una enfermedad descrita en caninos, que presenta varias similitudes clínicas y fisiopatológicas con la EA. Suele presentarse después de los 7 años de edad, y en el perro afectado presenta disminución progresiva de su capacidad cognitiva. Este declive cognitivo, suele manifestarse con desorientación, disminución o alteración de la interacción social, pérdida de los recuerdos adquiridos durante el entrenamiento casero o profesional, cambios en el ciclo sueño-vigilia, disminución de la memoria y de la actividad general [25-27].

Es importante considerar que algunos signos comportamentales en perros geriátricos, en ocasiones son considerados como rasgos propios del proceso de envejecimiento, sin embargo es fundamental diferenciar entre aquellas alteraciones relacionadas a un daño serio de los procesos cognitivos y las originadas a partir de una disminución leve en la actividad psicomotora [28, 29]. En este sentido, la gran variedad de signos clínicos observados en perros con SDC, puede ser clasificada dentro de 4 categorías [30]: alteración de la orientación en el medio ambiente inmediato, pérdida o disminución de las interacciones sociales con los miembros humanos de la familia, pérdida del entrenamiento casero y alteraciones del ciclo sueño-vigilia. Las alteraciones cognitivas (como la pérdida del entrenamiento y la alteración de la orientación) y las modificaciones de la interacción social observadas en el perro con SDC, probablemente estén muy relacionadas con los signos descritos para la EA [23].

Algunas de las lesiones histopatológicas reportadas en perros con SDC incluyen la inflamación de las meninges, gliosis, depósito amiloideo, degeneración de la mielina en la materia blanca y acumulación de productos del estrés oxidativo, además de alteraciones apoptóticas como recogimiento del citoplasma y un leve aumento en el tamaño del núcleo. La muerte celular apoptótica se ha descrito en cerebros de perros geriátricos afectados con SDC. La apoptosis induce pérdida neuronal relacionada a la acumulación

amiloidea y esta última, ha sido propuesta como el principal factor responsable de la demencia asociada a la edad [31].

Cambios neuroquímicos como niveles bajos de dopamina, noradrenalina, serotonina, Acetil-Colina, Acetil-Colino Transferasa, mayor actividad de la MAO y sensibilidad aumentada al glutamato, neurotransmisor capaz de ejercer efecto neurotóxico, han sido reportados en caninos afectados con esta neuropatología [32]. No obstante, la alteración de mayor consistencia en cerebros de perros con SDC es la acumulación del péptido β A a nivel del hipocampo y de la corteza frontal (áreas especialmente relacionadas con los cambios en el comportamiento cognitivo) [23, 24]. A nivel celular, este β A se concentra inicialmente dentro de microdominios de la membrana plasmáticas de neuronas de la corteza prefrontal, y posteriormente afecta otras regiones cerebrales como las cortezas parietal y entorrinal, tal como se observa en pacientes con EA [33].

Con respecto a la prevalencia e incidencia de la enfermedad, han sido desarrollados varios estudios de impacto regional que han propuesto el aumento en la población canina geriátrica y junto con esta, el incremento en los indicadores epidemiológicos de esta patología. Por ejemplo, una investigación realizada en Italia, incluyó 124 perros geriátricos y mostró una prevalencia cercana al 50%, en la que 75 perros mayores de 7 años presentaron signos coincidentes con SDC [26]. De igual manera, otro estudio reveló que el aumento en la presentación de signos asociados a SDC y sugirieron una estrecha relación entre el proceso de envejecimiento y la probabilidad de padecer SDC. Los resultados indicaron que el 28% de los perros entre 11 y 12 años, mostraron algún grado de déficit cognitivo mientras que aquellos individuos entre 15 y 16 años tenían una probabilidad cercana al 68% de sufrir la enfermedad. Tales conclusiones sugieren que al igual que en humanos, el aumento de edad es un factor determinante sobre la prevalencia de este tipo de enfermedades [24]. No obstante, los datos que muestran la prevalencia del SDC probablemente estén subestimados [26], debido a la tendencia de un gran número de propietarios a no reportar al Médico Veterinario cambios comportamentales observados en sus mascotas, ya que los asumen como aspectos intratables de la edad [34].

1.5 Muerte Neuronal en Enfermedades Neurodegenerativas

La muerte celular fue reconocida por primera vez como un mecanismo fisiológico durante el desarrollo de los sistemas vertebrados hace aproximadamente 70 años. Además, en las dos últimas décadas se ha enfatizado en el estudio de los mecanismos de degeneración y muerte celular como un punto clave para comprender los eventos celulares que subyacen al inicio y desarrollo de varias enfermedades y al proceso de envejecimiento [35].

Investigaciones recientes sugieren que las EN se caracterizan por provocar la muerte apoptótica de determinadas poblaciones neuronales (por ejemplo: neuronas colinérgicas en la EA y el SDC o neuronas dopaminérgicas en la EP) [35-40], por esto, durante los últimos años se ha profundizado mucho en la investigación de los mecanismos genéticos que operan en el sistema de muerte apoptótica, sin embargo, la extensión de conclusiones de estudios *in vitro*, a sistemas *in vivo* ha generado cierto grado de confusión, en parte por el uso indiscriminado del término apoptosis y, en ocasiones, por la carencia de métodos bien establecidos para discriminar la apoptosis de la necrosis [36].

De acuerdo con algunos autores [41-43], la apoptosis es un proceso biológico esencial para el desarrollo y homeostasis de los organismos, además es un proceso activo que se manifiesta con retracción celular, fragmentación nuclear, preservación de los organelos intracelulares, cambios en la asimetría de los fosfolípidos de membrana, formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis de la célula apoptótica, procesos que son iniciados y ejecutados por una maquinaria intrínseca y específica de “suicidio celular” [44].

Desde el punto de vista morfológico, la apoptosis presenta cuatro fases [45]: Una primera fase de precondensación, donde se genera la inducción de los genes requeridos, con la consiguiente activación de las proteínas y enzimas necesarias para el proceso apoptótico. La fase de condensación consiste en la disminución del volumen del núcleo y citoplasma, con condensación de la cromatina en el margen nuclear y pérdida de las interacciones entre la célula apoptótica y las vecinas. En la fase de fragmentación, las proteínas de la matriz nuclear se solubilizan, lo que hace al DNA susceptible de

degradación por endonucleasas dependientes de calcio y magnesio, las cuales degradan la cromatina nuclear que hace parte de los llamados cuerpos apoptóticos y estos corpúsculos aumentan progresivamente en número hasta que el núcleo se hace picnótico. Por último, la fase de fagocitosis, donde los cuerpos apoptóticos son fagocitados y degradados por las enzimas lisosomales de las células vecinas, sin respuesta inflamatoria alguna, por lo que no queda ni rastro de la célula afectada, unas horas después tras el comienzo del proceso.

Es importante considerar que el desarrollo del proceso apoptótico que participa en enfermedades neurodegenerativas, puede estar determinado por la presentación de diferentes factores de riesgo como la edad, el género [46], la historia familiar positiva [10], el genotipo [47] y por la exposición a ciertas neurotoxinas [48], entre otros.

Por otra parte, el conocimiento sobre los mecanismos directamente implicados en el padecimiento de este tipo de síndromes, ha llevado a la identificación de posibles factores y eventos fisiopatológicos comunes con capacidad de inducir y participar en el proceso apoptótico. Dentro de estos, se mencionan los citotóxicos endógenos como el β A, y los procesos patológicos como el estrés oxidativo y la sobrecarga de Ca^{2+} , las alteraciones mitocondriales, reticulares y del citoesqueleto y los estados de hipoxia cerebral, que posiblemente convergen y representan procesos secuenciales que interactúan potenciándose entre sí, desembocando en una vía final común de lesión celular [1, 36, 38, 49, 50].

En este sentido, a continuación se describen algunas condiciones bioquímicas y moleculares que han sido asociadas al desencadenamiento del cuadro fisiopatológico de las enfermedades descritas previamente, y su importancia como posibles inductores y perpetuadores de los mecanismos patológicos relacionados con la presentación y progresión de los signos clínicos observados durante el transcurso de estas neuropatologías.

1.5.1 Alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular

La elevación sustancial en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , es capaz de desencadenar una cascada de señales químicas que activan genes apoptóticos [51]. Así mismo, el aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico, activa determinadas enzimas Ca^{2+}

dependientes, como son las fosfolipasas, proteasas, endonucleasas y la propia NOS, todas ellas implicadas en la ejecución del programa de muerte celular [52].

Estos aumentos en la concentración de Ca^{2+} citosólico, son causados por el influjo de Ca^{2+} extracelular que penetra por canales acoplados a receptores regulados por voltaje o agonistas de los receptores para glutamato, por ejemplo, los agonistas NMDA [53]. Cuando el Ca^{2+} penetra en la célula, ésta tiende a evitar grandes elevaciones de su concentración mediante captura y almacenaje de éste catión en depósitos intracelulares tales como el retículo endoplasmático y la mitocondria, utilizando para ello bombas metabólicas dependientes de ATP. No obstante, la captura de Ca^{2+} por estos orgánulos, puede saturarse y ser ineficaz cuando los mecanismos que inducen su entrada a la célula persisten, al no cesar la causa inductora. Así, una vez los mecanismos tamponadores de Ca^{2+} se han saturado, ocurre una salida masiva del catión, desde estos almacenes intracelulares hasta el citosol y hacen que la bomba Ca^{2+} dependiente de ATP, resulte totalmente ineficaz. [54].

Sin embargo, no son éstas las únicas causas del mantenimiento de los niveles elevados de Ca^{2+} citosólico, la mitocondria también desempeña un importante papel [55]. Este orgánulo actúa como reservorio de Ca^{2+} , el cual penetra en su interior gracias a un transportador de tipo uniporte que funciona ininterrumpidamente mientras el potencial de membrana mitocondrial, se mantenga estable. El Ca^{2+} citosólico que entra en la mitocondria es empleado en la activación de determinadas deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos; además, su salida de la mitocondria por un mecanismo de cotransporte permite la introducción simultánea de Na^+ desde el citoplasma al interior de la mitocondria. No obstante, todo este sistema puede desequilibrarse como consecuencia de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. La pérdida de potencial se debe fundamentalmente a que en la mitocondria se puede abrir, de forma más o menos transitoria, un poro (MPTP, del inglés Mitochondrial Permeability Transition Pore) que de forma inespecífica deja salir hacia el hialoplasma iones y moléculas inferiores a 1,5 kDa, entre ellos Ca^{2+} , y de esta forma se disipa el potencial de membrana [56]. La pérdida del potencial de membrana mitocondrial no sólo implica reducción de los mecanismos productores de energía, sino que ello redundará en la pérdida de la homeostasis celular, que a su vez implica nuevos aumentos de Ca^{2+} citosólico y, por consiguiente, la

autoalimentación de un proceso que acaba provocando muerte celular mediante necrosis o apoptosis [57].

1.5.2 Estrés Oxidativo

Se ha sugerido específicamente que el estado de estrés oxidativo puede contribuir a la disfunción neuronal, y a la dinámica progresiva de la patología [23]. Esta idea se encuentra consignada en “la teoría de los radicales libres durante la vejez”, que fue propuesta en principio por Denham y Harman en 1956. Esta teoría postula que el exceso de especies reactivas de oxígeno (EROS), produce daño celular y su acumulación produce daños en múltiples tejidos [28].

Los radicales libres que producen mayor toxicidad corresponden al ion superóxido (O_2^-), el hidroxilo (OH^\cdot), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO^\cdot) y el peroxinitrito ($ONOO^\cdot$). Generalmente la acción perjudicial de los radicales se activa cuando los amortiguadores naturales de los radicales libres (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, vitaminas C y E) se ven desbordados [58] o cuando se activan procesos patológicos que favorecen la formación de estos, por ejemplo en el Síndrome de Isquemia Reperusión durante el ICTUS [59].

Las especies reactivas a oxígeno, pueden ocasionar en células y tejidos, un daño primario al oxidar directamente moléculas como lípidos (fundamentalmente ácidos poliinsaturados de las membranas), proteínas (principalmente enzimas) o ácidos nucleicos, y en este último caso, con el consiguiente riesgo de mutaciones. El daño generado en estas moléculas biológicas, puede iniciar una cascada de eventos, incluyendo disfunción de la respiración mitocondrial, excitotoxicidad, y la elevación del calcio citosólico, el cual conduce a la disfunción celular [60]. De forma secundaria, también pueden provocar la inhibición de la estimulación de diferentes neurotransmisores excitatorios (aspartato y glutamato), además, de disparar la activación de enzimas proteolíticas como las caspasas o las endonucleasas [49, 57, 61].

El metabolismo aeróbico de la mitocondria ha sido implicado en la producción de la mayoría (50-90%) de EROS, no obstante, además del origen mitocondrial, existen otros sitios y fuentes de generación metabólica de radicales libres, tales como los peroxisomas y la liberación de oxidantes por parte de los neutrófilos.

Propiamente, el estado de estrés oxidativo no es el causante directo ni el factor etiológico responsable de las neuropatologías, sin embargo, se ha sugerido que juega un papel patogénico importante en estas condiciones, y existen evidencias de que la presencia de radicales libres, produce el daño tisular y degenerativo secundario que acompaña a estas enfermedades. No obstante, aún no han sido determinados, los mecanismos oxidativos subyacentes a la activación de las cascadas de muerte celular, y los mecanismos oxidativos producto de la muerte neuronal [60].

1.6 Alternativas Terapéuticas

Los adelantos en el conocimiento de los mecanismos anteriormente descritos, han sido incluidos en estudios farmacológicos que buscan el desarrollo de alternativas terapéuticas para disminuir los efectos generados por las enfermedades de tipo neurodegenerativo. Así, en la actualidad la farmacología desarrolla dos líneas definidas de actuación fundamentales en las enfermedades neurodegenerativas: la primera línea es la etiopatogénica que tiene como objetivo detener la muerte celular y fomentar la recuperación de las poblaciones celulares ya afectadas, mediante la búsqueda de fármacos que modulen las rutas bioquímicas implicadas en estos procesos. La segunda línea de actuación, mucho más avanzada hasta la fecha, corresponde a la fisiopatológica que busca prevenir, retardar o paliar la aparición de la sintomatología propia de la alteración en los niveles de neurotransmisores como la acetilcolina en la EA y SDC, y la dopamina en la EP [4]. Teniendo en cuenta que hoy en día, son pocas las alternativas desarrolladas para prevenir patologías de tipo neurodegenerativo, los productos naturales en la actualidad han llegado a constituir un importante campo de la investigación farmacológica.

La Comisión Europea de Acción Concertada sobre la Ciencia de Alimentos Funcionales, define a un alimento como funcional o nutracéutico, cuando este, por medio de una demostración previa, ha mostrado efectos benéficos sobre una o más funciones metabólicas, generando así, una mejora en la salud y el bienestar, y/o una disminución del riesgo de padecer enfermedades [62].

En algunos casos la evidencia científica sobre los beneficios de los nutraceuticos en la salud humana es tan sólida y reconocida por la comunidad científica internacional, que los compuestos han sido avalados por agencias reguladoras gubernamentales como la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos.

Este tipo de productos, tras ser incluidos en la dieta habitual de los individuos con o sin predisposición a EN, han sido considerados por algunos investigadores, y por gran parte de la comunidad general, como opción alterna a los medicamentos tradicionales, ya que de acuerdo con varias investigaciones, parece ser que la inclusión en la dieta habitual de sustancias nutraceuticas como la creatina [63], los derivados de la vitamina E [64], algunos extractos de plantas como el Ginkgo Biloba [65] o incluso algunas sustancias producidas por las abejas, como el propóleo verde de Brasil, pueden llegar a prevenir la aparición de las EN [66, 67]. Por consiguiente, es probable que el descubrimiento adicional de determinadas sustancias nutraceuticas o alimentos funcionales que puedan prevenir la aparición de enfermedades asociadas al envejecimiento, puedan convertirse en una alternativa interesante para el manejo terapéutico y/o de prevención de las enfermedades neurodegenerativas.

Así, este tipo de sustancias con potencial nutraceutico capaz de prevenir las enfermedades neurodegenerativas, despiertan interés, no solo por su capacidad terapéutica, sino también por la posibilidad de hacerse partícipes de un interesante y creciente mercado, el cual, solo en Estados Unidos ocupa el segmento más grande del mercado, alcanzando US\$ 18,25 billones [68].

1.6.1 *Propóleo como producto nutraceutico*

El propóleo ocupa un lugar destacado dentro de la Apiterapia, y ha sido sujeto de varios estudios farmacológicos y químicos durante los últimos 30 años; algunos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado sus propiedades antifúngicas, antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes e incluso neuroprotectoras [69]. De igual manera, este producto se ha utilizado en la medicina popular, como constituyente de bio-cosméticos y alimentos funcionales, entre otros [70]. Así, de acuerdo con su origen botánico y composición química, las propiedades que le reservan un espacio de trascendencia

insospechada son la antioxidante, inmunoestimulante, antitumoral, neuroprotectora y citotóxica [71].

Específicamente, las abejas, recogen con sus mandíbulas partículas resinosas de las yemas, brotes y pecíolos de las hojas de diferentes vegetales, que, una vez en la colmena, mezclan con cera y secreciones salivares para obtener el propóleo, cuya producción anual (10-300 g/colmena) difiere en función de la variedad de abejas, el clima, la flora y el dispositivo de recogida. Además, en función de su origen botánico y de la época de recolección, difiere en color (de amarillo claro a castaño oscuro), sabor (amargo, ligeramente picante o insípido) y consistencia [69, 72]. Estos mismos determinantes, definen la composición particular de cada propóleo, llevando a la identificación de más de 300 constituyentes [71], dentro de los que se ha de incluir mezclas de resinas (50%), cera (30%), aceites esenciales (10%), polen (5%) y diferentes componentes orgánicos (5%), como por ejemplo, componentes fenólicos, terpenos, beta-esteroides, aldehídos aromáticos, alcoholes y sesquiterpenos y sus ésteres y flavonoides en todas sus formas (flavonoles, flavononas y dihidroflavonoles).

Dentro del grupo de flavonoides, se puede encontrar uno de particular interés para algunos científicos, denominado ester fenilico del ácido cafeico (CAPE). A este componente biológico del propóleo, se le han atribuido varias propiedades, incluyendo antiinflamatoria, antiviral, anestésica, hepatoprotectora, y se sugiere que puede actuar como factor preventivo ante injurias producidas por eventos de reperfusión sanguínea [73]. De igual manera, conforme con investigaciones previas, la capacidad protectora del CAPE, ha sido relacionada con propiedades biológicas de interés, incluyendo la antitumoral donde se ha observado una inhibición en el arresto de la progresión de la leucemia humana en células HL-60, y en diferentes tumores orales [74-76].

Con relación a su capacidad antioxidante, el CAPE ha mostrado ser un potente inhibidor de procesos lesivos como la peroxidación lipídica, la activación de lipoxigenasas y protein tirosin quinasa. Varios autores dedicados al estudio de la relación entre el CAPE y ciertos procesos patológicos, han demostrado que esta sustancia actúa como agente bloqueador de lesiones patológicas que incluyen procesos isquémicos espinales o cerebrales, disminución en las concentraciones de potasio y muerte neuronal inducida por 6-hidroxidopamina [77-79].

Debido a que los propóleos se caracterizan por poseer altas cantidades de polifenoles, las propiedades antioxidantes del propóleo, han sido objeto de estudio para varios investigadores. En evaluaciones previas [80], se estudió las propiedades antioxidantes del propóleo y sus constituyentes activos, mediante el uso de los extractos alcohólico y acuoso de propóleos chinos, australianos, neozelandeses y japoneses. Los resultados mostraron una capacidad antioxidante positiva, y dado que se encontró α -tocoferol como constituyente de las muestras estudiadas, este se relacionó con la propiedad antioxidante de los propóleos analizados. Pese a esto, no se descarta que el efecto antioxidante, sea producto de una acción sinérgica entre varios componentes [71, 81].

De igual manera, las capacidades antioxidantes del propóleo verde de Brasil han sido estudiadas en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* de degeneración neuronal [79, 80, 83, 84]. Los resultados de estos trabajos de investigación *in vitro*, han demostrado que este propóleo es capaz de prevenir la degeneración celular inducida por agentes donadores de radicales libres como el agua oxigenada o el DPPH. En cuanto a los estudios *in vivo*, la administración intraperitoneal de propóleo en ratones, redujo el tamaño del infarto cerebral inducido por el síndrome de Isquemia-reperfusión, tras la inducción de isquemia cerebral focal por medio de la ligadura de la arteria cerebral media [83].

Adicionalmente, estudios realizados con cultivos de células retinales ganglionares, mostraron el efecto neuroprotector de propóleo verde de Brasil, frente a efectos de estrés oxidativo como la privación de glucosa y oxígeno. [85]. De esta manera, estos datos científicos han repercutido de manera inmediata aumentando la demanda de este producto y, a futuro, hace que se considere a esta sustancia como un prototipo en el desarrollo de nuevos medicamentos. No obstante, habrá de tenerse en cuenta que a pesar de que la evidencia científica indica que todos los propóleos estudiados, presentan efecto antioxidante, no todos necesariamente, poseen propiedades neuroprotectoras.

Bibliografía

1. Arboleda G, Matheus L. Muerte celular. Blanco terapéutico en neurodegeneración y sepsis. *Rev Cienc Salud*. 2005;3(2):186-205.
2. Pérez J. El Síndrome de disfunción cognitiva en el perro. *Rec Vet*. 2007;2(1-4):1-9.
3. Boyd B. Ongoing progress in the Alzheimer's disease arena. *Drug News Perspect*. 2000;3:425-38.
4. Segura T, Galindo FM. Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Rev Neurol*. 2003;36(11): 1047-57.
5. Alzheimer's Disease International [Internet]. UK: [Consultado 21 de enero de 2005]. Common questions: Dementia statistics How many people have dementia? Disponible en: <http://www.alz.co.uk/alzheimers/faq.html>
6. Arboleda H, Yunis J, Alvarez C, Benítez B, et.al. Factores Genéticos, clínicos y ambientales asociados al desarrollo de demencias, movimientos anormales y depresión en población de adultos mayores. *Investig Segur Soc Salud*. 2007;9:179-201.
7. Martínez JM, Moya MA. Enfermedad de Alzheimer. En: Segovi JM, Mora F, editores. *Enfermedades Neurodegenerativas*. Madrid: Farmaindustria; 2002. p. 54-69.
8. Wilhelmsen KC. The tangle biology of tau. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;7120-21.
9. Marco J. Inhibidores clásicos y nuevos inhibidores de la acetilcolinesterasa para tratar la Enfermedad de Alzheimer. En: Segovi JM, Mora F, editores. *Enfermedades Neurodegenerativas*. Madrid: Farmaindustria; 2002. p. 141-56.
10. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev*. 2001;81:741-766.
11. Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-59.
12. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β - peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(2):101-12.
13. Kazuma M, Takahiko S, Kazuhiro I. Formation of the 42-mer Amyloid β Radical and the Therapeutic Role of Superoxide Dismutase in Alzheimer's Disease. *J Amino Acids*. 2011; Article ID 654207, 10 pages doi:10.4061/2011/654207.
14. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002; 416(6880): 535-39.
15. Meyer-Luehmann M, Spires TL, Prada C. Rapid appearance and local toxicity of amyloid- β plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 2008; 451(7179): 720-24.
16. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen P, Weiner M, et.al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 2010;9:119-28.

17. Fagan AM, Head D, Shah AR. Decreased cerebrospinal fluid A β (42) correlates with brain atrophy in cognitively normal elderly. *Ann Neurol* 2009;65:176–83.
18. Gustafson DR, Skoog I, Rosengren L, Zetterberg H, Blennow K. Cerebrospinal fluid beta-amyloid 1-42 concentration may predict cognitive decline in older women. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78:461–64.
19. Obeso JA, Rodríguez MC, Zamarbide I. Enfermedad de Parkinson. Perspectivas. En: Segovi JM, Mora F, editores. *Enfermedades Neurodegenerativas*. Madrid: Farmaindustria; 2002. p. 54-69.
20. Olanow CW, Stern MB, Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. *Neurology*. 2009;72 Suppl 4:S1-136.
21. Schapira AH. Etiology and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurol Clin*. 2009;27(3):583-603.
22. Chen JJ. Parkinson's disease: Health-related quality of life, economic cost, and Implications of early treatment. *Am J Manag Care*. 2010;16 Suppl:S87-93.
23. Head E. Brain aging in dogs: Parallels with human brain aging and Alzheimer's disease. *Vet Ther*. 2001;2(3): 247-60.
24. Neilson J, Hart B, Cliff K, Ruehl W. Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. *JAVMA* 2001; 218(11): 1787-1791.
25. Boutet I, Ryan M, Kulaga V, McShane C, Christie LA, Freedman M, et.al. Age-associated cognitive deficits in humans and dogs: a comparative neuropsychological approach. *Prog Neuro-Psycho Biol Psc*. 2005;29(3):433-441.
26. Osella M, Re G, Odore R, Girardi C, Badino P, Barbero R, et.al. Canine cognitive dysfunction syndrome: Prevalence, clinical signs and treatment with a neuroprotective Natraceutical. *Appl Anim Behav Sci*. 2007; (105): 297-310.
27. Ruehl WW, Bruyette DS, De Paoli A. Canine cognitive dysfunction as a model for human age-related cognitive decline, dementia and Alzheimer's disease: clinical presentation, cognitive testing, pathology and response to l-deprenyl therapy. *Prog Brain Res*. 1995;106:217–225.
28. Head E, Zicker S. Nutraceuticals, aging, and cognitive dysfunction. *Vet Clin Small Anim*. 2004;(34):217-228.
29. Rofina JE, van der Meer I, Goossens M, Secrève M, Ederen van AM, Schilder M, et.al. Preliminary inquiry to assess behavior changes in aging pet dogs. IXth International Symposium on Amyloidosis. 2001; 464-466.
30. Rofina JE, Singh K, Skoumalova A, van Ederen AM, van Asten AJ, Wilhelm J, et.al. Histochemical accumulation of oxidative damage products is associated with Alzheimer-like pathology in the canine. *Amyloid*. 2004;11:90-100.
31. Borrás D, Ferrer I, Pumarola. Age-related Changes in the Brain of the Dog. *Vet Pathol*. 1999;(36):202–211.
32. Pérez J. El Síndrome de disfunción cognitiva en el perro. *Rec Vet*. 2007;2(1-4):1-9.

33. Studzinski C, Araujo J, Milgram N. The canine model of human cognitive aging and dementia: Pharmacological validity of the model for assessment of human cognitive-enhancing drugs. *Progr Neuro-Psychoph Biol Psych*. 2005;29: 489-498.
34. Gallego D, Figueroa J, Orozco C. Síndrome de disfunción cognitiva de perros geriátricos. *Rev. MVZ Córdoba* 2010;15(3):2252-2262.
35. Thompson C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267:1456-1462.
36. Alvarez L, Macías R, Pavón N, Vidal L, Blanco L, Álvarez P, et.al. Factores que desencadenan la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas. *Rev. Neurol*. 1998;26(152): 554-60.
37. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993;262:689-95.
38. Orozco C, García A, Arias E, Hernández J. Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *Eur J Physiol*. 2006;553: 28–38.
39. Pavón N, Vidal L, Blanco L, Álvarez P, Torres A. Factores que desencadenan la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas. *Rev Neurol*. 1998;26(152):554-60.
40. Pugliese M, Gangitano C, Ceccariglia S, Carrasco J. Canine cognitive dysfunction and the cerebellum: Acetylcholinesterase reduction, neuronal and glial changes. *Brain Res*. 2007;1139:85-94.
41. Boumela I, Guillemin Y, Guérin JF, Aouacheria A. The Bcl-2 family pathway in gametes and preimplantation embryos. *Gynecol Obstet Fertil*. 2009 Sep;37(9):720-32.
42. Compton M. A biochemical hallmark of apoptosis: Intranucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metast Rev*. 1992;11:105-119.
43. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R. Cell death: Apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol*. 2002;21(1):165-70.
44. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(2):120-129.
45. Mckinnon SJ. Glaucoma, apoptosis and neuroprotection. *Curr Opin Ophthalmol*. 1997;8(2): 28-38.
46. Shulman L. Gender differences in Parkinson's disease. *Gender Med*. 2007;4(1): 8-18.
47. García A, Gandia L. Fronteras en la enfermedad de Alzheimer. En: Segovi JM, Mora F, editores. *Enfermedades Neurodegenerativas*. Madrid: Farmaindustria; 2002. p. 38-9.
48. Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol*. 2009;169(8):919-26.
49. Butterfield D. Amyloid beta-peptide (1-42) induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. *Free Radic Res*. 2002;36:1307-13.

50. Yu SP, Canzoniero LM, Choi DW. Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:405-11.
51. Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;887:1830.
52. Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Sign.* 1999;11:7785.
53. Mills LR. The sodiumcalcium exchanger and glutamate induced calcium loads in aged hippocampal neurons *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;15:37990.
54. Paschen W, Doutheil J. Disturbance of endoplasmic reticulum functions: a key mechanism underlying cell damage? *Acta Neurochir Suppl.* 1999;73:15.
55. Rustin P, von KleistRetzow J, Vajo Z, Rotig A, Munnich A. For debate: defective mitochondria, free radicals, cell death, agingreality or mithochondria? *Mech Aging Dev.* 2000; 1144: 2016.
56. Sugrue MM, Wang Y, Rideout HJ, Chalmers RM, Tatton WG. Reduced mitochondrial membranes potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p53 induced senescence. *Biochem Biophys Commun.* 1999;261: 2330.
57. Peinado M, Moral M, Esteban F, Martínez E, et.al. Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Rev Neurol.* 2000;31(11):1054-65.
58. Waypa GB, Schumacker PT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol.* 2005;98:404-14.
59. Sobrado M, Roda JM, Lopez MG, Egea J, Garcia AG. Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation. *Neurosci Lett.* 2004;365(2):132-6.
60. Jellinger K. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm.* 2009;116:1111-62.
61. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med.* 2000;78:3-13.
62. European Commission Concerted Action on Functional Food Science. Scientific concepts of functional foods in Europe. *Br J Nutr.* 1999; 81(1) Suppl:S1-27.
63. Candow DG, Chilibeck PD. Timing of creatine or protein supplementation and resistance training in the elderly. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008;33(1):184-90.
64. Meydani M. Vitamin E and prevention of heart disease in high-risk patients. *Nutr Rev.* 2000;58(9):278-81.
65. Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ, Buford JP, et al. Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:12197-202.
66. Aruoma O, Baborun T, Jen L. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutat Res.* 2003;544(2-3):203-15.

67. Zhu S, Li M, Figueroa BE, Liu A, Stavrovskaya IG, Pasinelli P, Beal MF, Brown RH Jr, Kristal BS, Ferrante RJ, Friedlander RM. Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. *J Neurosci*. 2004;30:24-6.
68. Soto D, Emma W, Guerrero L, Garrido F, Fuenzalida R. Alimentos funcionales: comportamiento del consumidor chileno. *Rev Chil Nut.* 2006;33(1).
69. Farré R, Frasquet I, Sánchez A. El propólis y la salud. *Ars pharmaceutica*. 2004;45(1): 21-43.
70. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*. 1999;64(3):235–240.
71. Banskota A, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of Propolis. *Phytother Res*. 2001;15:561–71.
72. Martínez A. Diagnóstico de la actividad apícola y de la crianza de abejas en Colombia. Ministerios de Agricultura y desarrollo rural, Instituto interamericano de cooperación para la agricultura IICA, 2006.
73. Wei X, Fontanilla C, Zhao L, Xu Z, Dodel R, Du Y. Caffeic acid phenethyl ester prevents cerebellar granule neurons (CGNs) against glutamate-induced neurotoxicity. *Neurosci*. 2008;155: 1098–1105.
74. Chen JH, Shao Y, Huang MT, Chin CK, Ho CT. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. *Cancer Lett*. 1996; 108(2):211-4.
75. Lee YJ, Liao PH, Chen WK, Yang CY. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Lett*. 2000;153(1-2):51-6.
76. Viuda M, Y. Ruíz Y, Fernandez A, López A, Pérez J. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *J Food Science*. 2008;73(9):117-24.
77. Amodio R, De Ruvo C, Sacchetti A, Di Santo A, Martelli N, Di Matteo V, et.al. Caffeic acid phenethyl ester blocks apoptosis induced by low potassium in cerebellar granule cells. *Int J Dev Neurosci*. 2004;22(1):57.
78. Irmak MK, Fadillioglu E, Sogut S, Erdogan H, Gulec M, Ozer M, et.al. Effects of caffeic acid phenethyl ester and alpha-tocopherol on reperfusion injury in rat brain. *Cell Biochem Funct*. 2003;21(3):283-9.
79. Wei X, Zhao L, Ma Z, Holtzman DM, Yan C, Dodel RC, et.al. Caffeic acid phenethyl ester prevents neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Brain*. 2004;127(12):2629-35.
80. Oyaizu M, Ogiwara H, Fujimoto H. Antioxidative activity of extracts of propolis. *Nihon Yukagakkaiishi* 1999;48:135-138.
81. Aljadi AM, Kamaruddin M. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem* 2004; 85:513–8.
82. Moreno M, Isla M, Sampietro A, Vattuone M. Comparison of the free radicals scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol*. 2000;71:109-114.

83. Noelker C, Bacher M, Gocke P, Wei X, Klockgether T, Du Y, Dodel R. The flavanoide caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett* 2005;383 (1-2):39-43.
84. Shimazawa M, Chikamatsu S, Morimoto N, Mishima S, Nagai H, Hara H. Neuroprotection by Brazilian green Propolis against *In vitro* and *In vivo* Ischemic Neuronal Damage. *Ecam* 2005;2(2):201-07.
85. Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Neuroprotective effects of Brazilian green propolis and its main constituents against oxygen-glucose deprivation stress, with a gene-expression analysis. *Phytother Res*. 2009;23(10):1431-8.

Capítulo 2. Evaluación *in vitro* de la mortalidad inducida por H₂O₂ y KCl en células SHSY-5Y

**H₂O₂ and KCl-induced cytotoxicity in human neuroblastoma cells SHSY-5Y.
Implications for the study of neurodegenerative diseases.**

2.1 Resumen

Existen varios mecanismos moleculares involucrados en la muerte neuronal patológica de enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson. Estudios previos han sugerido que tal muerte celular puede ser provocada por la activación de la maquinaria apoptótica, la que a su vez, puede ser inducida por una gran variedad de factores incluyendo el aumento del Estrés Oxidativo y el incremento en los niveles de Ca²⁺ citosólico. Por lo tanto, el diseño de modelos *in vitro* que puedan ser incluidos en estudios de neurodegeneración enfocada a las alteraciones oxidativas y/o del calcio neuronal, es una alternativa óptima para el adelanto en el conocimiento de aspectos moleculares o terapéuticos asociados a estas enfermedades. En nuestro trabajo, células SHSY-5Y fueron expuestas a concentraciones variadas de H₂O₂ y KCl con el objeto de determinar una concentración específica de este citotóxico capaz de producir una disminución de la viabilidad celular entre un 40-60%. Esta viabilidad fue evaluada con el método de tinción de MTT y los resultados indicaron que concentraciones de 1μM y 25mM de H₂O₂ y KCl, respectivamente, son suficientes para inducir una disminución del porcentaje de supervivencia celular, hasta en un 40-60% (p≤0.05). En conclusión, sugerimos que este modelo *in vitro* puede ser empleado como herramienta de estudio de tópicos relacionados con enfermedades como la enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson.

Palabras clave: Calcio, Despolarización, Estrés oxidativo, Modelos celulares, Neurodegeneración, Peróxido de hidrógeno, Potasio.

Abstract

Several molecular mechanisms involved in neuronal death at neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Previous studies have suggested that cell death can be triggered by activation of the apoptotic machinery, which in turn, can be induced by variety of factors, including increased levels of cytosolic Ca^{2+} , thus the design of *in vitro* models that can be included in neurodegeneration study focused on intra and extraneuronal calcium changes, is an optimal alternative to the advancement in the knowledge of molecular and therapeutic aspects associated with these diseases. In our work, SHSY-5Y cells were exposed to varying concentrations of KCl to determine the specific concentration of the cytotoxic capable of producing a decrease in cell viability between 40-60%. This viability was assessed with MTT staining method, and the results indicated that a concentration of 25 mM KCl is sufficient to induce a decrease in the percentage of cell survival by up to 40-60%. In conclusion, we suggest that this model can be used *in vitro* as a tool to study topics related to diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease.

Key words: Calcium, Cellular models, Depolarization, Hydrogen peroxide, Neurodegeneration, Potassium. Oxidative stress.

2.2 Introducción

Las Enfermedades Neurodegenerativas (EN) son desórdenes neurológicos progresivos que se caracterizan por la pérdida de sinapsis y poblaciones neuronales en áreas específicas del Sistema Nervioso Central, lo cual determina el inicio y el curso de los signos clínicos en cada enfermedad [1, 2].

Son varios los factores a los que se les ha comprobado su capacidad de inducir o participar en procesos apoptóticos asociados a las EN [3, 4] y entre estos se encuentran la formación excesiva de radicales libres y/o la alteración en la homeostasis del calcio [5-10].

De acuerdo con algunos autores [11], el aumento en la concentración de Ca^{2+} intraneuronal puede conducir a la activación de rutas moleculares entre las que se incluyen las proteincinasas, las fosfolipasas A2, la óxido nítrico sintasa y las proteasas. Adicionalmente, los mecanismos tamponadores de Ca^{2+} se saturan y generan la salida masiva del catión desde los reservorios intracelulares (retículo endoplásmico y mitocondria) hacia el citosol, provocando una total disfunción de la bomba Ca^{2+} dependiente de ATP, mayor liberación de Ca^{2+} , activación de cascadas de señalización química y expresión de genes proapoptóticos [12-14].

Los cambios en la homeostasis del Ca^{2+} pueden actuar como vía común entre el envejecimiento y los cambios neuropatológicos asociados con la EA [15]. A esta teoría se le dio el nombre de “la hipótesis del calcio en el envejecimiento cerebral y la Enfermedad de Alzheimer”. Así mismo, estudios más recientes sobre neurotoxicidad de la Proteína βA en la EA, indican que las proteínas $\beta\text{A-40}$ y $\beta\text{A-42}$, pueden formar poros permeables al Ca^{2+} sobre la membrana plasmática, lo que generalmente conduce a un incremento del Ca^{2+} citosólico y consecuente activación de rutas apoptóticas [16, 17].

Estudios previos realizados con células cromafines de bovino, sugieren que la despolarización con 30 mM de potasio extracelular $[\text{K}^+]_{\text{E}}$, induce muerte celular dependiente de mecanismos de Ca^{2+} , como los descritos anteriormente. Durante esta despolarización inducida con potasio, el calcio entra a la célula, preferentemente por medio de canales L, con el objeto de inducir muerte celular necrótica o apoptótica, dependiendo del tiempo de concentración del Ca^{2+} en el citosol [18]. Así mismo, estudios de imágenes funcionales en neuronas con indicadores de Ca^{2+} citoplasmático libre [19], demostraron que el citoplasma neuronal puede sufrir aumentos en las concentraciones de Ca^{2+} bajo una variedad de estímulos, incluyendo las altas concentraciones de KCl [20].

En este sentido, los efectos del potasio sobre la integridad neuronal pueden ser considerados como una herramienta de evaluación en estudios *in vitro* de neurotoxicidad [21], ya que este catión puede inducir de manera directa, alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, lo cual puede emular la activación de las cascadas de señalización dependientes de Ca^{2+} reportadas en relación a la fisiopatologías de enfermedades como la EA.

Adicionalmente, el incremento en el Ca^{2+} citosólico puede provocar un aumento excesivo del flujo de este catión hacia la mitocondria, lo cual incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno [18, 22].

El H_2O_2 es la especie reactiva de oxígeno más estable, por lo cual, posee la capacidad de actuar como segundo mensajero en vías de supervivencia (i.e. vía asociadas a actividad quinasa, o en vías de oxidación de cisteínas en sitios activos de diversas fosfatasas) [23], o en vías de muerte celular [24]. También se ha sugerido que este radical libre puede inducir la fosforilación de la proteína quinasa Akt, inactivar la fosforilación de ERK [25], y activar a NF- κ B a través de la fosforilación del I κ B α (inhibidor del complejo NF- κ Bor p50/p62) [26, 27], o por medio de la activación del complejo IKK [28]. Una vez se produce la fosforilación de I κ B α , se libera el dímero activo de la NF- κ B, y se trasloca al núcleo, donde transcribe diversos genes antiapoptóticos y proapoptóticos (i.e. p53) [29].

En pacientes con EA se ha observado que las especies reactivas reducen el metabolismo energético además de la actividad de la Citocromo C oxidasa [30, 31] y de acuerdo con algunos autores, estos procesos pueden conducir a la extensiva atrofia cortical e hipocampal y a la neurodegeneración características de la EA [32, 21]. Por esto, la inclusión del H_2O_2 como herramienta citotóxica en ensayos de viabilidad neuronal enmarcada en el área de la neurodegeneración, ha sido ampliamente utilizada en modelos neuronales *in vitro*, con el objeto de reproducir características celulares que reflejen el comportamiento in vivo de poblaciones neuronales específicas, frente a la acción de moléculas pro-oxidantes altamente relacionadas con procesos de neurodegeneración asociados al proceso de envejecimiento.

Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto neurotóxico de las altas concentraciones de H_2O_2 y KCl sobre células de neuroblastoma humano, SHSY-5Y, con el fin de analizar los porcentajes de mortalidad en cultivos indiferenciados y de esta manera, determinar las concentraciones necesarias de cada citotóxico, para provocar una disminución de la viabilidad celular de esta línea neuronal, entre un 40-60%.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Reactivos

Línea celular SH-SY5Y, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) (Cat. CRL-2266) (Manassas, VA, USA). Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), Suero Fetal Bovino (SFB) y Mezcla Penicilina/Estreptomicina /Anfotericina marca GIBCO/INVITROGEN® (Grand Island, NY, USA). Solución Tripsina-EDTA 0,25%, Dimetil sulfoxido-DMSO grado cultivo celular y MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), marca SIGMA® (St. Louis, MO, USA). Frascos para cultivo celular de 75 cm² marca NUNC® (Rochester, NY, USA), Cloruro de Potasio (KCl) marca MERCK® (Darmstadt, Germany) y Peróxido de Hidrógeno al 30% H₂O₂, Ref IPO14001 de As Analytical (Bogotá, Colombia).

2.3.2 Mantenimiento de la línea celular SHSY-5Y

La línea celular SHSY-5Y son el tercer subclon sucesivo de la línea de neuroblastoma humano (SKN-SH) [33], y ha sido ampliamente usada como modelo neuronal desde los principios de la década de los 80's [34].

Se obtuvo un vial de células SHSY-5Y congeladas en pase 23. El proceso de descongelación se realizó de acuerdo a protocolos previos [35], donde el vial se descongeló en baño maría a 38°C y posteriormente, el pool de células se centrifugó en medio DMEM/F-12 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% de antibiótico. Una vez completada la centrifugación (900rpm durante 5 minutos), se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células en medio fresco suplementado. Finalmente, las células se sembraron en cajas T-25 cm², y se dejaron en la incubadora a 37°C y CO₂ al 5%, haciendo cambios de medio cada 2-3 días, hasta que la capa de células confluyera en la superficie de la caja.

Una vez se observó confluencia entre 90-95%, se realizó un pase de células a frascos de cultivo T75 cm², cambiando la mitad de medio completo cada 1-2 días, para así, aumentar la población celular. Posteriormente, se procedió con la siembra de células en placas de 24 pozos, a una densidad de 90.000 células/pozo, en 500 ml de medio suplementado. 24 horas después, las células fueron sometidas a los diferentes tratamientos.

2.3.3. Exposición a H_2O_2

Las células SHSY-5Y se expusieron a diferentes concentraciones de H_2O_2 , con el objeto de encontrar una concentración capaz de generar una disminución de la viabilidad celular hasta en un 40-60%. Para esto, se consideraron diferentes concentraciones de H_2O_2 reportadas con anterioridad y se seleccionó un intervalo en el que se decidió incluir 7 concentraciones iniciales para determinar la concentración de muerte deseada. Las concentraciones se incluyen en la Tabla I.

Para obtener las diferentes concentraciones, se realizaron diluciones de la solución madre de H_2O_2 en agua destilada y filtrada, y a continuación se evaluó cada concentración por triplicado en tres experimentos independientes. Las placas se dejaron en incubación durante 24 horas y posteriormente se realizó la evaluación de la viabilidad celular por medio del ensayo de MTT.

2.3.4. Exposición a KCl

Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 9×10^4 células por pozo, en 500 μ l de medio DMEM/F-12 suplementado, y una vez adheridas, se realizaron los siguientes tratamientos: células control, células con 1mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 50mM, 70mM, 90mM, 100mM, 150mM y 200mM de KCl. Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C y 5% CO_2 durante un periodo de 24 horas y finalmente se procedió a determinar la viabilidad celular en cada tratamiento, utilizando el método de coloración MTT.

2.3.5. Determinación de la viabilidad celular

La cuantificación de la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico MTT. Este ensayo es una prueba colorimétrica para la cuantificación de la viabilidad celular. Su principio se basa en la reducción del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, en un pigmento conocido como formazán [36, 37]. Esta reducción intracelular depende, en gran medida, de la actividad reductasa mitocondrial generada a partir de las reacciones catalíticas acopladas a la NADPH-, y a los sistemas rédox dependientes de NADPH [38, 39]. La depleción de cofactores asociados a las reacciones rédox, se correlaciona de manera directa con la pérdida de la viabilidad celular, por lo

tanto, la actividad reductasa sobre el MTT, es considerado como un marcador óptimo de viabilidad celular [40].

Para dar inicio a este procedimiento se adecuaron las condiciones necesarias para trabajar en la cabina de seguridad biológica, donde se retiró el medio de todos los pozos y se adicionaron 100µl de solución MTT en cada pozo (5mg de MTT/ml de PSB). A continuación, las placas de células se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante un periodo mínimo de 2 horas, y luego se retiró el MTT. Posteriormente, se adicionaron 200µl de DMSO en cada uno de los pozos y nuevamente se incubaron las placas durante 30-40min. Una vez transcurrido este tiempo, se retiraron las placas de la incubadora, y se pusieron en agitación lenta sobre una placa de agitación durante 5 minutos. La lectura se realizó en espectrofotómetro a una Densidad Óptica (DO) de 492nm.

2.3.6. Análisis Estadístico

Los datos se presentan como el $X \pm D.E$ de mínimo 6 experimentos independientes. Se realizó la prueba de normalidad de D'Agostinos y Pearson, seguida del Análisis de Varianza de Una Vía (ANOVA). Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey, y a continuación se aplicó una prueba de Dunnet para comparación de medias. Se consideró $P \leq 0.05$ como valor estadísticamente significativo. Los datos fueron analizados con el programa informático GraphPadPrism versión 5.0.

2.4 Resultados

Citotoxicidad por H₂O₂

Las células SHSY-5Y no diferenciadas, fueron expuestas a concentraciones crecientes de H₂O₂ durante 24 horas (Figura 2-1), y posteriormente se cuantificó el porcentaje de mortalidad inducida por la citotoxina mediante el método MTT. Para establecer las concentraciones experimentales óptimas, se realizaron curvas dosis-respuesta (Figura 2-3) y se realizó el análisis estadístico respectivo.

Los resultados obtenidos sugieren que a concentraciones de 500nM de H₂O₂ la viabilidad celular no presenta diferencias significativas con respecto a las células no tratadas, es decir, que las concentraciones $\leq 500nM$, no afectan de manera significativa

la viabilidad de células SHSY-5Y indiferenciadas, tras un periodo de exposición de 24 horas. Adicionalmente, las concentraciones $\geq 25\mu\text{M}$ de H_2O_2 parecen inducir una mortalidad celular alrededor del 80%, mientras que a concentraciones de $12.5\mu\text{M}$ de H_2O_2 la mortalidad celular se encuentra cerca del 60%. Finalmente, cuando las células SHSY-5Y indiferenciadas fueron expuestas a una dosis de $1\mu\text{M}$ de H_2O_2 durante un periodo de 24 horas, se observa una disminución aproximada del 55% en la viabilidad celular.

Citotoxicidad por KCl

Las células SHSY-5Y no diferenciadas, fueron expuestas a concentraciones crecientes de KCl durante 24 horas (Figura 2-2). La morfología de las células tratadas muestra una pérdida total de la morfología, ausencia de proyecciones o procesos celulares y desprendimiento celular. Adicionalmente, las células que permanecen adheridas tienden a formar aglomerados altamente refringentes, en los que no se identifica el crecimiento en forma de malla que es evidente en células indiferenciadas no tratadas.

Para evaluar la viabilidad celular, las concentraciones iniciales fueron evaluadas con la prueba MTT y posteriormente se seleccionaron las concentraciones que provocaron un porcentaje de muerte celular entre 10-90%. A partir de estos datos, se escogieron 6 concentraciones de KCl (1mM, 25mM, 50mM, 75mM, 100mM, 125mM) que fueron sometidas a evaluación realizando un mínimo de 6 repeticiones para cada dosis (Figura 2-4), con el objeto de determinar una dosis capaz de reducir la viabilidad celular entre un 40-60%.

Los resultados obtenidos sugieren que una dosis de 1Mm de KCl no ejerce un efecto citotóxico considerable en células SHSY-5Y indiferenciadas, ya que no se observa una diferencia significativa entre las células tratadas y las células control. Adicionalmente, las concentraciones $\geq 75\text{mM}$ de KCl, muestran un efecto citotóxico capaz de disminuir la viabilidad celular en un porcentaje $\geq 75\%$, mientras que una concentración de 50mM de KCl, provoca una disminución de la viabilidad celular cercana al 40%. Finalmente, cuando las células SHSY-5Y indiferenciadas son expuestas a una concentración de 25Mm de KCl durante un periodo de 24 horas, se observa una disminución aproximada del 50% en la viabilidad celular.

2.5 Discusión

Los procesos moleculares involucrados en neuropatologías de carácter progresivo, tales como la EA y la EP, son caracterizados por su alta complejidad y origen multifactorial. No obstante, muchos de los factores involucrados en la dinámica fisiopatológica de tales enfermedades, han sido identificados con anterioridad en diversos estudios.

Algunas de las hipótesis que han intentado dilucidar la patogénesis de este tipo de enfermedades, incluyen la formación y agregación patológica de proteínas como la β A, Tau y la α -sinucleína [41], la excitotoxicidad [42], la inflamación [5, 43-45], el EO [46, 47] y el incremento sostenido de Ca^{+2} intracelular [20, 21].

La teoría del EO en relación al origen y/o desarrollo de estas enfermedades, parece contribuir en gran medida a la perpetuación de los mecanismos celulares que conducen a la característica pérdida neuronal. Por ejemplo, en cerebros de pacientes con EA, se evidencian lesiones mediadas por la acción oxidante de las ERO's, con un aumento en los niveles de malondialdehído y 4-hidroxinonenal (marcadores de peroxidación lipídica) tanto en cerebro como en el fluido cerebroespinal [48]. Además, en comparación con controles geriátricos, se observa un aumento en las concentraciones de guanina hdroxilada en muestras de pacientes con EA [49], lo que refleja el aumento en los niveles de EO en personas afectadas con este tipo de demencia. En la EP, los cerebros de pacientes afectados presentan una disminución en la concentración de ácidos grasos libres insaturados de la sustancia nigra, mientras que los niveles de marcadores de peroxidación lipídica se encuentran incrementados [50]. Adicionalmente, se ha evidenciado daño oxidativo de proteínas [51], e incremento de las delecciones del ADN mitocondrial en células dopaminérgicas vivas en la sustancia nigra de pacientes afectados y tales delecciones parecen ser resultado del EO [52, 53].

Una de las moléculas con mayor actividad durante estos procesos oxidativos es el H_2O_2 y sus derivados, ya que se relaciona con la patogénesis de proteínas mal plegadas como el péptido β -amiloide [54, 55] y disfunción del complejo I mitocondrial en la EP [55, 56]. Adicionalmente, muchas de las mutaciones genéticas asociadas a la presentación de estas enfermedades, parecen estar relacionadas con EO y alteraciones mitocondriales [57, 58]. Por ejemplo, trabajos previos encontraron un aumento en los niveles de malonildialdehído y de superóxido dismutasa en la sangre periférica de pacientes con EP

y con mutaciones en el gen PARKIN [59]; además, se ha sugerido que la mutación p.G2019S en el gen de LRRK2, genera H_2O_2 e induce neurotoxicidad por activación de quinasas [60]; y las mutaciones en APP y PSEN1, inducen EO cerebral [61].

Con respecto a la relación del Ca^{+2} en la fisiopatología de la EA y EP, es importante considerar que algunos autores han reportado perturbaciones en la homeostasis del calcio [62-64]. Esta alteración del calcio implica varios mecanismos, como las alteraciones celulares de la capacidad buffer para el calcio, las modificaciones en la actividad de los canales de calcio, o la excitotoxicidad [65].

Adicionalmente, se sabe que el Ca^{2+} es un importante segundo mensajero en vías de transducción de señales y en neuronas. Este Ca^{2+} ingresa a través de dos principales rutas, canales dependientes de Ca^{2+} tipo L y receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). El influjo de Ca^{2+} hacia el interior de la neurona, conduce a una activación de quinasas y fosfatasas, las que a su vez, regulan la fosforilación de proteínas y expresión génica [66].

Algunas de las vías celulares en las que actúa el Ca^{2+} como segundo mensajero, son capaces de activar la transcripción del complejo CREB (cAMP-elemento de respuesta unido a proteína) [67, 68]. Este CREB ha sido relacionado con procesos neuronales como formación de memoria, potenciación a largo término [69] y neuroplasticidad [70]. Adicionalmente, CREB es capaz de activar el gen c-fos [66], y gracias a las investigaciones realizadas en la activación transcripcional de este gen en cultivos hipocámpales, se ha observado que la entrada de Ca^{2+} estimulada por cloruro de potasio (KCl), conduce a la activación de diferentes vías de señalización, ya que el KCl actúa sobre canales tipo L-dependientes de Ca^{2+} y activa a c-fos [70].

Son pocas las evidencias que soportan el papel directo de la disregulación de la homeostasis del calcio, como factor responsable de la pérdida neuronal en enfermedades como la EA y la EP, sin embargo, algunos autores sugieren la disregulación de este catión como evento principal del proceso neurodegenerativo [71].

La importancia del conocimiento de los mecanismos oxidativos y de la homeostasis del Ca^{+2} , implicados en el desarrollo de neuropatías como la EA y la EP, radica en el acercamiento a nuevos blancos terapéuticos capaces de estimular las defensas intracelulares ante este tipo de eventos. En este sentido, el uso de líneas celulares expuestas a sustancias neurotóxicas como el H_2O_2 y el KCl, se han empleado en diversos

estudios de citotoxicidad y/o neuroprotección. En este ámbito, la línea SHSY-5Y ha sido ampliamente utilizada ya que exhibe características de neuronas dopaminérgicas, poseen actividad enzimática de marcadores neuronales (tirosina y dopamina- β -hidroxilasas), son capaces de realizar recaptación específica de norepinefrina y además, poseen la capacidad de proliferar en cultivo durante largos periodos de tiempo, sin sufrir contaminación, un prerequisite para el desarrollo de cualquier modelo celular *in vitro* [72]. Adicionalmente, estas células pueden ser diferenciadas con el objeto de obtener un fenotipo neuronal más diferenciado con desarrollo de neuritas, no obstante se ha sugerido que la diferenciación de este tipo celular, puede alterar la susceptibilidad celular frente a agentes neurotóxicos y neuroprotectores [73, 74], por lo tanto, en este trabajo se decidió emplear células SHSY-5Y no diferenciadas con el objeto de expresar respuestas más fidedignas ante la exposición de H_2O_2 y KCl.

En nuestro estudio, los cambios de viabilidad generados a partir de la exposición de H_2O_2 en células SHSY-5Y indiferenciadas, mostraron que a concentraciones de $1\mu M$ del citotóxico, es posible generar una disminución de la viabilidad celular en un 40-60%, y por lo tanto, este modelo de citotoxicidad podría ser válido para detectar sustancias con un potencial neuroprotector significativo ante las lesiones neuronales provocadas por el aumento de EROs, como el H_2O_2 , y el EO.

Por su parte, el uso de KCl para provocar la hiperdespolarización de cultivos neuronales, es una herramienta de investigación ampliamente utilizada en diversos estudios. Por ejemplo, en estudios previos se empleo una concentración de 20mM de KCl para inducir despolarización por activación de canales de Ca^{2+} tipo L, en neuronas estriatales e hipocampales. Los resultados sugieren que la despolarización por KCl en ambos tipos celulares, actúa de forma distinta [66].

2.6 Conclusión

Existen evidencias científicas que señalan al estrés oxidativo como un mecanismo patológico que podría estar implicado en varios aspectos de las rutas fisiopatológicas que han sido parcialmente dilucidadas en desórdenes como la EA y la EP. Por tanto, el uso de moléculas prooxidantes en diseños experimentales que incluyan la utilización de modelos neuronales *in vitro*, es una herramienta capaz de emular las condiciones de EO

relacionado con la fisiopatología de este tipo de enfermedades. Una de las moléculas de mayor participación en este proceso es el H_2O_2 y por consiguiente, su uso como control de citotoxicidad, es ampliamente utilizado en la evaluación *in vitro* del potencial neuroprotector de diversas sustancias de tipo antioxidante. En este sentido, la estandarización de la concentración necesaria de H_2O_2 en el diseño de un control de muerto válido, es un factor relativo a las condiciones experimentales, por consiguiente, el conocimiento de este tipo de resultados puede ser de utilidad en estudios de neuroprotección.

A pesar de que son varias las investigaciones que incluyen el uso de KCl en sus diseños experimentales, muchas de ellas destinan los efectos despolarizantes del potasio, al estudio de señales de transducción mediadas por canales de Ca^{2+} tipo L. No obstante, los efectos del KCl también podrían ser conducidos a la hiperdespolarización de poblaciones neuronales afectadas en Enfermedades Neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson. Esto con el fin de provocar una sobrecarga de Ca^{2+} intraneuronal, capaz de activar proteasas, lipasas y endonucleasas, que estimulen la degradación de componentes celulares, junto con un aumento de los radicales libres y consecuente EO. Estas características de lesión celular son coincidentes a los factores involucrados en la muerte neuronal inducida por apoptosis, una de las teorías incluidas en el estudio de EN. Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio plantean el uso del KCl como herramienta investigativa en el desarrollo de un modelo óptimo de neurotoxicidad que busque evaluar efectos neuroprotectores de diversas sustancias, dirigidas al tratamiento o acompañamiento de terapias previamente instauradas para el manejo de patologías como la Enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson.

De esta manera, y con el objeto de aportar datos concretos sobre la dosis letal 40-60% de H_2O_2 y KCl en células SHSY-5Y indiferenciadas, este trabajo concluye que el uso de una concentración de $1\mu M$ de H_2O_2 y una concentración de $25mM$ de KCl, es capaz de inducir una reducción de la viabilidad hasta en un 55%.

Tablas

Tabla I. Concentraciones de H₂O₂ seleccionadas para disminuir la viabilidad celular entre un 40-60% en la línea celular SHSY-5Y

Experimento 1	300μM, 3μM, 0.3μM, 100 μM, 1μM, 0,1 μM y 10nN
Experimento 2	3μM, 10μM, 30μM, 40μM, 50μM, 60μM, 90μM
Experimento 3	30μM, 60μM, 90μM
Experimento 4	30μM, 90μM, 120μM, 150μM
Experimento 5	150μM, 300μM, 450μM, 600μM
Experimento 6	25μM, 50μM, 100μM, 200μM
Experimento 7	1μM, 900nM, 700nM, 900nM.
Experimento 8	25μM, 12.5μM, 1μM, 700 nM

Tabla I. Concentraciones iniciales de H₂O₂ utilizadas en la línea celular SHSY-5Y, con el objeto de realizar una curva dosis respuesta sobre la disminución de la viabilidad de las células indiferenciadas.

Figuras

Figura 2-1. Células SHSY-5Y expuestas a concentraciones crecientes de H_2O_2

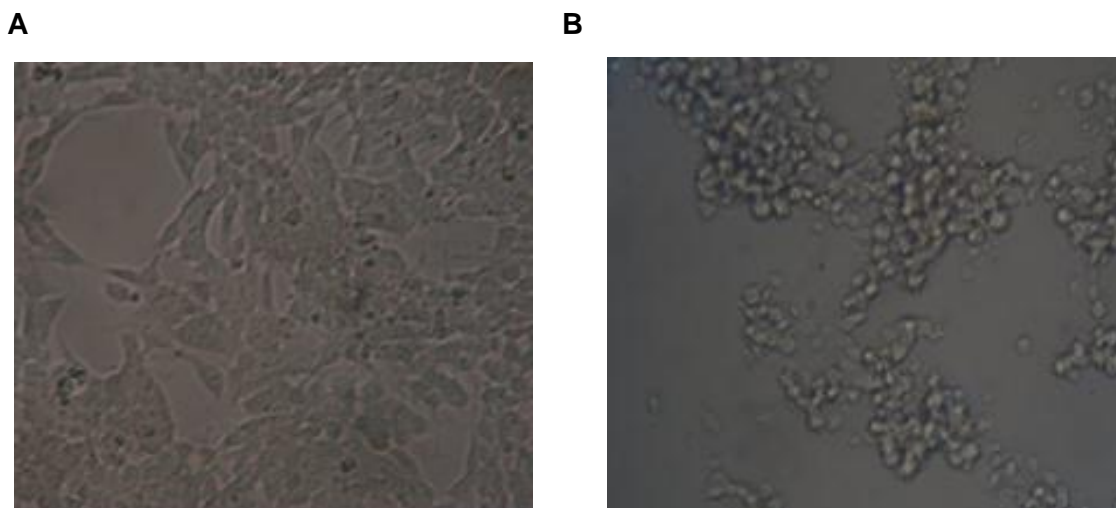


Figura 2-1. Células SHSY-5Y no diferenciadas vistas en microscopio invertido. A. Células control donde se observa la integridad y la formación de una capa celular estable. B. Células expuestas a concentraciones mayores de 50 μM de H_2O_2 durante 24 horas. Se observa la pérdida de cuerpos celulares, desprendimiento de la capa de células, y pérdida de la morfología.

Figura 2-2. Células SHSY-5Y expuestas a concentraciones crecientes de KCl

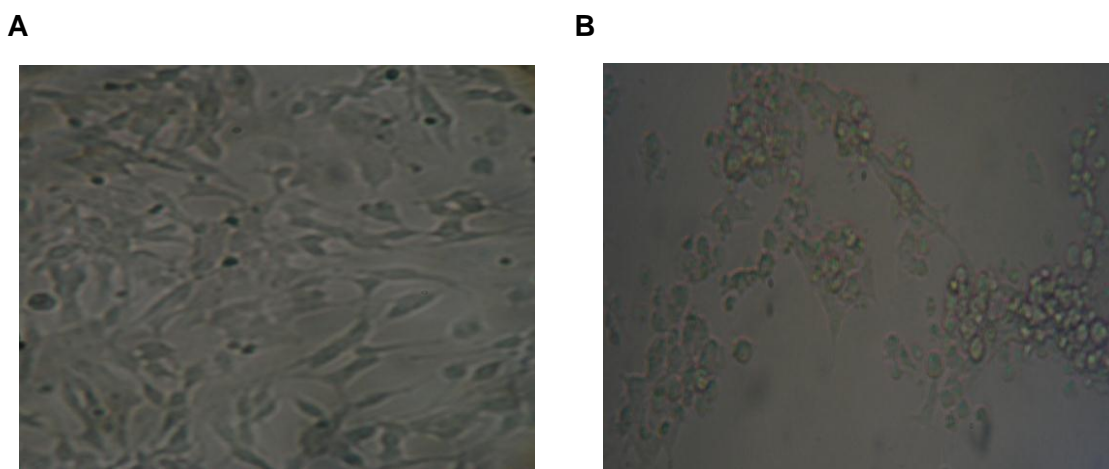


Figura 2-2. Células SHSY-5Y no diferenciadas vistas en microscopio invertido. A. Células no tratadas. Se observan somas alargados, integridad celular y una confluencia celular adecuada. B. Células expuestas a concentraciones mayores de 100 mM de KCl durante 24 horas. Se observa pérdida de la integridad celular, ausencia de capa celular y agregados celulares refringentes.

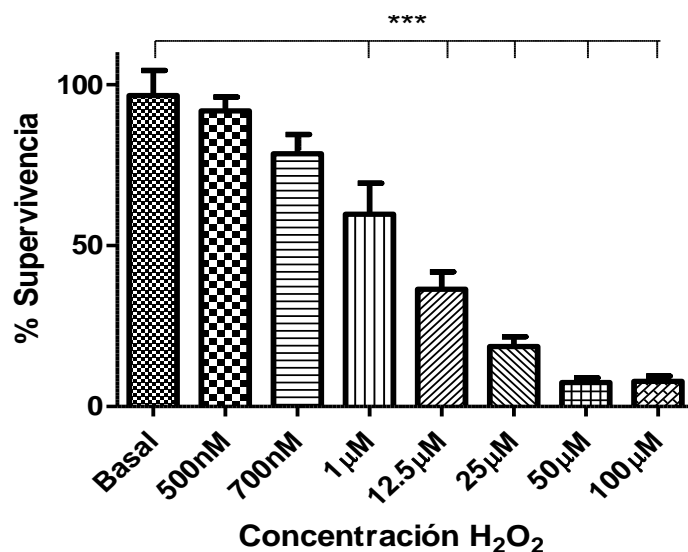
Figura 2-3. Viabilidad de células SHSY-5Y expuestas a H_2O_2 

Figura 2-3. Células SHSY-5Y expuestas a concentraciones crecientes de H_2O_2 . El porcentaje de viabilidad fue determinado con la técnica MTT. Los datos representan la media \pm SEM de mínimo 6 experimentos independientes con $***P < 0.05$.

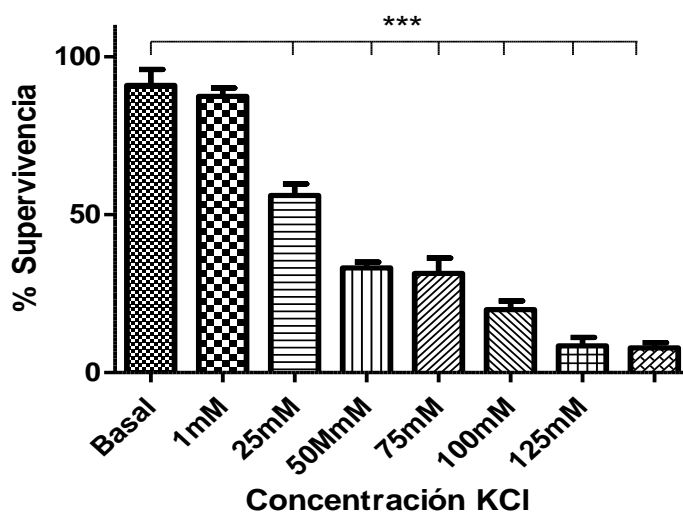
Figura 2-4. Viabilidad de células SHSY-5Y expuestas a KCl

Figura 2-4. Porcentaje de viabilidad de células SHSY-5Y indiferenciadas, expuestas a concentraciones crecientes de KCl. El porcentaje de viabilidad fue determinado con la técnica MTT. Los datos representan la media \pm SEM de mínimo 6 experimentos independientes con $***P \leq 0.05$.

Bibliografía

1. Kannappan R, Chandra S, Kim J, Reuter S, Bhushan B. Neuroprotection by Spice-Derived Nutraceuticals: You Are What You Eat!. *Mol Neurobiol*. 2011;44(2):142-59.
2. Jellinger K. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm*. 2009;116:1111-62.
3. Orozco C, García A, Arias E, Hernández J. Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *Eur J Physiol*. 2006;553: 28–38.
4. Pugliese M, Gangitano C, Ceccariglia S, Carrasco JL, Del Fà A, Rodríguez MJ, et.al. Canine cognitive dysfunction and the cerebellum: Acetylcholinesterase reduction, neuronal and glial changes. *Brain Res*. 2007;1139:85-94.
5. Butterfield D. Amyloid beta-peptide (1-42) induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. *Free Radic Res*. 2002; 36:1307-13.
6. Birbes H, Bawab SE, Obeid LM, Hannun YA. Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis. *Adv Enzyme Regul*. 2002;42:113-29:113-29.
7. Jordan J, Galindo MF, Garcia C, Ceña V. Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria. *Br J Pharmacol*. 2003;139(4):797-804.
8. Maillet M. Manual de biología molecular. 1ra ed. Masson, editor. Barcelona: Fotoletra; 2002.
9. Tatton WG, Olanow CW. Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1410(2):195-213.
10. Siskind LJ, Colombini M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J Biol Chem*. 2000;275(49):38640-44.
11. Annunziato L, Amoroso S, Pannaccione A, Cataldi M, Pignataro G, D'Alessio A, et.al. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol Lett*. 2003;139(2-3):125-33.
12. Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and Calcium: an overview. *Cell Signal* 1999;11:7785.
13. Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;887:1830.
14. Starkov AA, Polster BM, Fiskum G. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J Neurochem*. 2002;83:220-28.
15. Khachaturian ZS. Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain. *Neurobiol Aging*. 1987;8:345-46.

16. Arispe N, Rojas E, Pollard HB. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:567-71.
17. Supnet C, Bezprozvanny I. The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. *Cell Calcium*. 2010;47(2):183-89.
18. Cano M, Villarroaya M, García A, Gabilán M, López N. Contribution of calcium entry through L-type calcium channels to chromaffin cell death. *An NY Acad Sci*. 2002;971:171-73.
19. Connor JA. Digital imaging of free Ca²⁺ changes and of spatial gradients in growing processes in single mammalian cns cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:6179-83.
20. Connor JA, Tseng HY, Hockberger PE. Depolarization and transmitter-induced changes in intracellular Ca²⁺ of rat cerebellar granule cells in explant culture. *J Neurosci*. 1987;7:1384-400.
21. Takahashi S, Shibata M, Fukuuchi Y. Effects of increased extracellular potassium on influx of sodium ions in cultured rat astroglia and neurons. *Dev Brain Res*. 1997;104:111-17.
22. Brustovetsky N, LaFrance R, Purl KJ, Brustovetsky T, Keene CD, Low WC, et.al. Age dependent changes in the calcium sensitivity of striatal mitochondria in mouse models of huntington's disease. *J Neurochem*. 2005;93:1361-70.
23. Groeger G, Quiney C, and Cotter TG. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxidants and Redox Signaling* 2009; 11(11): 2655–2671.
24. Jiménez M, Velez C. The Bad, the Good, and the Ugly about Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2012 Feb;1-13. doi:10.1155/2012/428010. Article ID 163913. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/oximed/2012/163913/>
25. Melo A, Monteiro L, Rute MF, Lima R, de Oliveira D, de Cerqueira D, et.al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2011;1-14. doi: 10.1155/2011/467180. Article ID 467180. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/oximed/2011/467180/>
26. Gil B, Sanz MJ, Terencio MC, Ferrandiz ML, Bustos G, Payà M, et al. Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipase A2 and inflammatory responses in mice. *Life Sci* 1994;54:333–8.
27. Glasgow JN, Wood T, Perez-Polo JR. Identification and characterization of nuclear factor- κ B binding sites in the murine bcl-x promoter. *J Neurochem* 2000;75: 1377–89.
28. Golbe L, Farrell TM, Davis PH. Case-control study of early life dietary factors in Parkinson's disease. *Arch Neurol*. 1998;45:1350-3.
29. Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio C, Algeri S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol Aging*. 2002;23:719-35.
30. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006;443:787-95.

31. Maurer I, Zierz S, Moller HJ. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging*. 2000;21:455-62.
32. de Leon MJ, Mosconi L, Blennow K, DeSanti S, Zinkowski R, Mehta PD, et.al. Imaging and CSF studies in the preclinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann N.Y. Acad Sci*. 2007;1097:114-45.
33. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL: Coordinate morphological and biochemical Interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1983;71:741-7.
34. Nishida Y, Adati N, Ozawa R, Maeda A, Sakaki Y, Takeda T. Identification and classification of genes regulated by phosphatidylinositol 3-kinase- and TRKB-mediated signaling pathways during neuronal differentiation in two subtypes of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y *BMC Res Notes*. 2008;1:95.
35. Langdon SP. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Volumen 88 de *Methods in molecular medicine Biomed Protocols*. Langdon SP Ed. ISBN1592594069; Humen Press Inc; 2004.
36. Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine dependent cell lines. *J Immunol Meth*. 1993;157:233-40.
37. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
38. Klein HH, Puschmann S, Schaper J, Schaper W. The mechanism of tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch Acta*. 1981;393:287-97.
39. Slater TF. Studies on succinate-neotetrazolium reductase system of rat liver. II. Points of coupling with the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1963;77:365-82.
40. Gomez LA, Alekseev A, Aleksandrova L, Brady P, Terzic A. Use of the MTT assay in adult ventricular cardiomyocytes to assess viability: Effects of adenosine and potassium on cellular survival. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(4):1255-66.
41. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med*. 2001;7: 548-54.
42. Rego AC, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*. 2003;28:1563-74.
43. Ho GJ, Drego R, Hakimian E, Masliah E. Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4:247-56.
44. Panaro MA, Cianciulli A. Current opinions and perspectives on the role of immune system in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Curr Pharm Des*. 2012;18(2):200-08.
45. Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:289-305.

46. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 1997;23:134-47.
47. Pimentel C, Batista L, Rodrigues C, Menezes RA. Oxidative Stress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Insights from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:132-146.
48. Lovell MA, Ehmann W, Butler S, Markesbery W. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 1995;45(8):1594-1601.
49. Mecocci P, Polidori MC, Ingegneri T, Cherubini A, Chionne F, Cecchetti R, et al. Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients. *Neurology* 1998;51(4):1014-17.
50. Dalfo EP, Portero MM, Ayala VP, Martinez A, Pamplona RM, Ferrer IM. Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64:816-30.
51. Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(9):797-803.
52. Bender A, Krishnan K, Morris C, Taylor G, et al. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 2006;38(5):515-17.
53. Gandhi S, Abramov A. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2012 Mar:1-11. doi:10.1155/2012/428010. Article ID 428010. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/oximed/2012/428010/>
54. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid-beta protein toxicity. *Cell* 1994;77:817-27.
55. Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol.* 1992;32:804-12.
56. McCoy MK, Cookson MR. Mitochondrial quality control and dynamics in parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(9):869-82.
57. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53 (Suppl 3):S26-38.
58. Schapira AH, Gegg M. Mitochondrial contribution to Parkinson's disease pathogenesis. *Parkinson's Disease* [Internet]. 2011 Feb:1-7. doi:10.4061/2011/159160. Article ID 159160. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/pd/2011/159160/>
59. Vinish M, Anand A, Prabhakar S. Altered oxidative stress levels in Indian Parkinson's disease patients with PARK2 mutations. *Acta Biochim Pol.* 2011;58(2):165-69.
60. Heo HY, Park JM, Kim CH, Han BS, Kim KS, Seol W. LRRK2 enhances oxidative stress-induced neurotoxicity via its kinase activity. *Exp Cell Res.* 2010;316(4):649-56.
61. Mohammad H, Wenk GL, Gramling G, Hauss-Wegrzyniak B, Butterfield DA. APP and PS-1 mutations induce brain oxidative stress independent of dietary cholesterol: implications for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2004;368(2):148-50.

62. Mattson MP: Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. 2004;430:631-39.
63. Mattson MP: Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*. 2007;6:337-50.
64. Thomas B, Beal MF: Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2007;16:R183-194.
65. Marambaud P, Dreses-Werringloer U, Vingtdeux V. Calcium signaling in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*. 2009;4:20. doi:10.1186/1750-1326-4-20.
66. Macias W, Carlson R, Rajadhyakshab A, Barczaka A, Konradia C. Potassium chloride depolarization mediates CREB phosphorylation in striatal neurons in an NMDA receptor-dependent manner. *Brain Res*. 2001;890:222-32
67. Sheng M, Thompson MA, Greenberg M. CREB: a Ca(2+)- regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases, *Science*. 1991;252:1427-30.
68. Tan YW, Zhang SJ, Hoffmann T, Bading H. Increasing levels of wild-type CREB up-regulates several activity-regulated inhibitor of death (AID) genes and promotes neuronal survival. *BMC Neurosci*. 2012;13(1):48.
69. Chen G, Zou X, Watanabe H, van Deursen JM, Shen J. CREB binding protein is required for both short-term and long-term memory formation. *J Neurosci*. 2010;30(39):13066-77.
70. Barco A, Marie H. Genetic approaches to investigate the role of CREB in neuronal plasticity and memory. *Mol Neurobiol*. 2011;44(3):330-49.
71. Wojda U, Salinska E, Kuznicki J: Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*. 2008;60:575-90.
72. Xie H, Hu L, Li G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J*. 2010;123(8):1086-92.
73. Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* 2009;30:127-13.
74. Shen JH, Zhang Y, Wu NH, Shen YF. Resistance to geldanamycin-induced apoptosis in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*. 2007;414:110-14.

Capítulo 3. Estudio del efecto neuroprotector de los propóleos producidos en Colombia.

Study of neuroprotective effect of propolis produced in Colombia.

3.1 Resumen

El uso de sustancias naturales como herramienta terapéutica para el tratamiento de enfermedades como la Enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson, es un tema de creciente interés debido a la relación existente entre la fisiopatología de estas enfermedades, y los mecanismos de estrés oxidativo. El propóleo es una sustancia antioxidante de gran potencial neuroprotector, por lo tanto, en nuestro estudio se evaluaron los efectos citoprotectores de propóleos colombianos, en células SHSY-5Y indiferenciadas y expuestas a los citotóxicos H_2O_2 y KCl. Los efectos de los tratamientos con propóleo sobre la viabilidad celular, fueron determinados con la prueba de tinción MTT y la citotoxicidad fue definida con la prueba de cuantificación de liberación de la enzima LDH. Adicionalmente, se realizó la evaluación de una muestra comercial de propóleo verde de Brasil, ante los efectos tóxicos del KCl. Los resultados indicaron una ausencia de capacidad citoprotectora de los propóleos colombianos, y de la muestra control de propóleo verde de Brasil, evaluadas a concentraciones de 50µg-1pg ($p \geq 0.05$).

Palabras Clave: Antioxidantes, Cultivos celulares, Estrés Oxidativo, Propóleo, Neuroprotección.

Abstract

The use of natural substances as a therapeutic tool for the treatment of diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease is a topic of growing interest because of the relationship between the pathophysiology of these diseases, and oxidative stress mechanisms. A substance neuroprotective antioxidant potential, propolis is therefore, in our study, we evaluated the cytoprotective effects of propolis Colombian SHSY-5Y cells undifferentiated and exposed to cytotoxic H_2O_2 and KCl. The effects of treatments on cell viability propolis were determined by MTT staining test and cytotoxicity test was defined with the quantification of the enzyme LDH release. Additionally, we performed an evaluation of a commercial sample of Brazilian Green Propolis, to the toxic effects of KCl. The results indicated an absence of cytoprotective capacity of Colombian propolis and control sample Brazilian Green Propolis, evaluated at concentrations of $50\mu g-1pg$ ($p \geq 0.05$).

Key words: *Antioxidants, Culture cells, Neuroprotection, Oxidative stress, Propolis.*

3.2 Introducción

Las Enfermedades Neurodegenerativas (EN) son neuropatías de carácter progresivo que provocan muerte de poblaciones neuronales específicas, lo que resulta en el deterioro de diversas funciones motoras y/o cognitivas. Dentro de este grupo de patologías se incluyen la Enfermedad de Alzheimer (EA), y la Enfermedad de Parkinson (EP), cuyos aspectos epidemiológicos, fisiopatológicos, clínicos, sociales y económicos, las han convertido en las dos EN de mayor importancia alrededor del mundo [1-8].

Son varios los adelantos obtenidos en el conocimiento de las bases fisiopatológicas asociadas a estas enfermedades, no obstante, los mecanismos específicos que conducen a la muerte de las poblaciones neuronales, aún no han sido plenamente establecidos.

Sin embargo, se han identificado diversas vías moleculares capaces de activar los mecanismos iniciadores de la disfunción neuronal de neuropatías como la EA y la EP.

Por ejemplo, los procesos de inflamación, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, y déficit del transporte axonal, parecen poseer algún papel en estas enfermedades [9, 10]. Además, la disfunción proteosomal, las respuestas celulares a estrés crónico, la disfunción en los procesos de autofagia, y la disregulación del calcio, parecen ser características comunes a varias EN [11-13]. Por lo tanto, el establecimiento de una relación acertada entre los diversos mecanismos patológicos asociados a las vías de muerte neuronal en EN, se ha convertido en un importante desafío [14].

Adicionalmente, reportes previos incluyen la muerte neuronal apoptótica dentro del grupo de mecanismos fisiopatológicos asociados a la pérdida celular en enfermedades como la EA y la EP. En este sentido, es importante considerar que el desarrollo del proceso apoptótico que participa en estas EN, puede estar determinado por la presentación de diferentes factores de riesgo, incluyendo la edad [15], el género [16], la historia familiar positiva [17], el genotipo [18] y por la exposición a ciertas neurotoxinas [19] entre otros.

Por otra parte, el conocimiento sobre los mecanismos fisiopatológicos directamente implicados en el padecimiento de este tipo de síndromes, ha llevado a la identificación de posibles factores con capacidad de inducir y participar en el proceso apoptótico. Dentro de estos, se mencionan procesos como el Estrés Oxidativo (EO) y la sobrecarga de Ca^{2+} , capaces de inducir alteraciones mitocondriales, reticulares y del citoesqueleto [20-24].

El EO y las especies reactivas a oxígeno, pueden ocasionar un daño primario en células y tejidos, al oxidar directamente moléculas como lípidos (fundamentalmente ácidos poliinsaturados de las membranas), proteínas (principalmente enzimas) o ácidos nucleicos, y en este último caso, con el consiguiente riesgo de mutaciones. El daño generado en estas moléculas biológicas, puede iniciar una cascada de eventos, incluyendo disfunción de la respiración mitocondrial, excitotoxicidad, y la elevación del calcio citosólico, el cual conduce a la disfunción celular [25]. De forma secundaria, también pueden provocar la inhibición de la estimulación de diferentes de neurotransmisores excitatorios (aspartato y glutamato), además, de disparar la activación de enzimas proteolíticas como las caspasas o las endonucleasas [26, 27].

En el contexto de los aspectos fisiopatológicos de EN relacionadas con el envejecimiento, el EO y sus efectos deletéreos sobre la integridad celular, han cobrado gran interés en la búsqueda de las vías moleculares relacionadas con el desarrollo de la EA. Por ejemplo, estudios previos [28], demostraron que la toxicidad en esta enfermedad

se asociaba a la proteína βA , lo que originaba una producción incrementada de H_2O_2 . Estos autores demostraron también que la catalasa bloquea la toxicidad del βA , lo que permite comprender cómo el H_2O_2 y sus derivados, como el radical OH^\cdot , pueden causar peroxidación lipídica que conduce a muerte celular neuronal en esta enfermedad [29]. Además, la hemoxigenasa1, la Cu\ZnSOD y la MnSOD, han sido identificadas en ovillos neurofibrilares de cerebros humanos con EA, lo cual puede sugerir una interacción estrecha entre ERO y/o los productos de éstas, y las anomalías del citoesqueleto propias de la patología neurofibrilar desarrollada en la EA. Además, se ha sugerido que la toxicidad celular del βA que se encuentra relacionada específicamente con el daño por ERO o sus productos, genera agregaciones proteicas insolubles que, como se sabe, es un evento crucial en la EA [29].

En relación a la EP, el EO incluye disfunción mitocondrial, auto-oxidación de la dopamina, agregación de α -sinucleína, activación de células gliales, alteraciones en la señalización de calcio, y exceso de metales libres. Adicionalmente, diversos estudios postmortem han aportado evidencia que valida la relación entre el EO y la patogénesis de la enfermedad. En particular, esta evidencia incluye alteraciones en los contenidos de metales en el cerebro, alteraciones de la función mitocondrial, disminución de los sistemas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión reducido), y evidencia de daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN [30- 33].

Adicionalmente, la monoamino oxidasa B (MAO-B), posee un papel relevante en los procesos relacionados con el EO, y el daño oxidativo en la EP. MAO-B es esencial para la conversión del 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), al ion 1-metil-4-fenilpiridinium, componente específico del metabolismo de la dopamina, hasta H_2O_2 [34-36].

Además del EO, la sobrecarga de calcio también puede ser reconocida por su participación en los mecanismos inductores de muerte apoptótica asociada a EN. La elevación sustancial en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , es capaz de desencadenar una cascada de señales químicas que activan genes apoptóticos [37]. Esta activación está precedida por la activación de determinadas enzimas Ca^{2+} dependientes, como son fosfolipasas, proteasas, endonucleasas y la propia NOS, todas ellas implicadas en la ejecución del programa de muerte celular [38, 39].

Adicionalmente, cuando el Ca^{2+} penetra en la célula, ésta tiende a evitar grandes elevaciones de su concentración mediante captura y almacenaje del catión en depósitos intracelulares tales como el retículo endoplasmático y mitocondria, utilizando para ello bombas metabólicas dependientes de ATP. No obstante, la captura de Ca^{2+} por estos orgánulos, puede saturarse y ser ineficaz cuando los mecanismos que inducen su entrada a la célula persisten, al no cesar la causa inductora. Así, una vez los mecanismos tamponadores de Ca^{2+} se han saturado, ocurre una salida masiva del catión, desde estos almacenes intracelulares hasta el citosol y hacen que la bomba Ca^{2+} dependiente de ATP, resulte totalmente ineficaz [40].

Sin embargo, no son éstas las únicas causas del mantenimiento de los niveles elevados de Ca^{2+} citosólico, la mitocondria también desempeña un importante papel [41]. Este orgánulo actúa como reservorio de Ca^{2+} , el cual penetra en su interior gracias a un transportador de tipo uniporte que funciona ininterrumpidamente mientras el potencial de membrana mitocondrial, se mantiene estable. Este Ca^{2+} citosólico que entra en la mitocondria es empleado en la activación de determinadas deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos; además, su salida de la mitocondria por un mecanismo de cotransporte permite la introducción simultánea de Na^+ desde el citoplasma al interior de la mitocondria. No obstante, todo este sistema puede desequilibrarse como consecuencia de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. La pérdida de potencial se debe fundamentalmente a que en la mitocondria se puede abrir, de forma más o menos transitoria, un poro (MPTP, del inglés Mitochondrial Permeability Transition Pore) que de forma inespecífica deja salir hacia el hialoplasma iones y moléculas inferiores a 1,5 kDa, entre ellos Ca^{2+} , y de esta forma se disipa el potencial de membrana [42]. La pérdida del potencial de membrana mitocondrial no sólo implica reducción de los mecanismos productores de energía, sino que ello redundará en la pérdida de la homeostasis celular, que a su vez implica nuevos aumentos de Ca^{2+} citosólico y, por consiguiente, la autoalimentación de un proceso que acaba provocando muerte celular mediante necrosis o apoptosis.

En este sentido, el reconocimiento del EO y de la sobrecarga de calcio como mecanismos involucrados en la patogenia de EN como la EA y la EP, podría poseer un valor importante en el desarrollo de terapias capaces de limitar el progreso de estas neuropatías, ya que los tratamientos con sustancias antioxidantes o bloqueadores de

canales de calcio (i.e. selegilina) han mostrado cierta efectividad protectora ante el desarrollo de este tipo de enfermedades [31, 43, 44].

Reportes recientes han señalado la capacidad antioxidante y neuroprotectora de diversas sustancias de origen natural como el propóleo [45]. Este subproducto apícola se compone de una mezcla compleja de resinas, ceras, aceites esenciales, polen y saliva de abeja; y ha sido utilizado ampliamente en el tratamiento de diversas enfermedades [45, 46] gracias a sus propiedades antibacteriales [47], antiinflamatorias [48], antioxidantes [49], y anticancerígena [50].

Se han identificado más de 200 componentes en diferentes muestras de propóleo, entre los que se incluyen ácidos grasos, fenoles, ésteres, terpenos y β -esteroides [51, 52]. No obstante, muchas de las múltiples propiedades terapéuticas atribuidas a los propóleos, parecen estar determinadas principalmente por el contenido de polifenoles como el ácido fenilestercafeico (CAPE) [53, 54], cuyas concentraciones difieren en función de la variedad de abejas, el clima, la flora y el dispositivo de recogida de las muestras de propóleos.

Numerosos estudios en modelos de neurodegeneración *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que los polifenoles pueden prevenir y/o reducir el daño oxidativo generado por los radicales libres [55-57]. Además, algunos de los estudios epidemiológicos relacionados con los efectos neuroprotectores de los polifenoles, han establecido una clara relación entre estos efectos y la disminución del riesgo a la disfunción neurológica asociada al envejecimiento, tales como las referentes a EA y a la EP [58]. Sin embargo, la naturaleza de aquellos efectos protectores, no solo se limita a las propiedades antioxidantes, ya que recientes estudios *in vitro*, sugieren que polifenoles como el resveratrol y el EGCG, además de poseer la capacidad de reciclar radicales libres directamente, también puede regular los efectos citotóxicos de los oligómeros de β A, vía fosforilación de la fosfoquinasa C (PKC), modulación de las alfa, beta y gamma secretasas e inhibición de la formación, neurotoxicidad y neuroinflamación de los oligómeros de β A [5, 59, 60]. Por esto, para evaluar la capacidad neuroprotectora de los propóleos colombianos ante la acción de mecanismos proapoptóticos como el EO y sobrecarga de calcio, en este estudio *in vitro* se emplearon muestras de propóleos provenientes de 3 diferentes zonas geográficas colombianas. Tales muestras fueron desafiadas frente a los efectos citotóxicos provocados por la acción del H_2O_2 y el KCl, capaces de producir aumento del

EO y sobrecarga de calcio intracelular, conducentes a una tasa de muerte celular entre el 40 y el 60%, en la línea de neuroblastoma humano SHSY-5Y indiferenciada. El porcentaje de supervivencia celular fue evaluado con la técnica de tinción MTT. Los resultados indicaron que los propóleos no presentan un efecto citoprotector en células expuestas a H_2O_2 y KCl, no obstante, dos muestras de propóleos Cundiboyacenses presentaron un leve efecto citoprotector en células expuestas a KCl ($*p \leq 0.05$). El porcentaje de citotoxicidad relacionado con estas muestras, fue reevaluado en ensayos con prueba de cuantificación de liberación de LDH (Lactato Deshidrogenasa), y comparado con una muestra de propóleo verde de Brasil, como control positivo de neuroprotección.

Los resultados indicaron que los propóleos colombianos y la muestra de Própolis Verde de Brasil presentaron una ausencia de capacidad citoprotectora en los modelos de muerte neuronal empleados en este estudio.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Reactivos

Los reactivos empleados fueron: Línea celular SH-SY5Y, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) (Cat. CRL-2266) (Manassas, VA, USA). Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), Suero Fetal Bovino (SFB) y Mezcla Penicilina/Streptomycin/Anfotericina marca GIBCO/INVITROGEN® (Grand Island, NY, USA). Solución Tripsina-EDTA 0,25%, Dimetil sulfoxido (DMSO) grado cultivo celular y MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) marca SIGMA® (St. Louis, MO, USA), CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (cuantificación LDH), marca PROMEGA® (Madison, USA). Frascos para cultivo celular de 75 cm² marca NUNC® (Rochester, NY, USA), Cloruro de Potasio (KCl) marca MERCK (Darmstadt, Germany), y H_2O_2 Ref IPO14001, As Analytical (Bogotá, Colombia).

3.3.2 Muestras de propóleos

Se evaluaron 26 muestras de extractos etanólicos de propóleos provenientes de tres diferentes regiones geográficas: 11 muestras provenientes de la Sierra Nevada de Santa Marta, 7 muestras provenientes del Valle del Cauca, 8 muestras provenientes del Altiplano Cundiboyacense y una muestra comercial de propóleo verde de Brasil. Estas

muestras fueron obtenidas del Laboratorio de Microbiología y Epidemiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

La obtención de estos extractos etanólicos se realizó con etanol y agua en una relación volumen/masa 70:30, es decir, 70 partes de etanol al 96% ó al 70% por 30 partes de propóleo bruto. A continuación, los extractos fueron almacenados en recipientes estériles de vidrio, tapados herméticamente, protegidos de la luz y en refrigeración a 4°C. Se realizó un proceso agitación mecánica cada 3 a 4 días, durante 30 días, y finalmente, se filtraron para ser reservadas hasta su uso posterior [61].

Para establecer las concentraciones de los extractos etanólicos de los propóleos que serían adicionados a los cultivos celulares, se consideraron datos experimentales previos [45] y de esta manera, los extractos etanólicos al 70% y al 96% fueron desafiados frente a concentraciones específicas de H₂O₂ y KCl, capaces de reducir la viabilidad celular en un 40-60%. Las concentraciones seleccionadas de propóleos fueron: 50µg, 1µg, 100ng, 1ng, 100 pg y 1 pg.

Para obtener estas concentraciones, todas las muestras de los extractos etanólicos de los propóleos fueron diluidas en medio DMEM/F-12, filtradas a través de membranas millipore de 0.22 µm y conservadas en condiciones estériles a -4°C.

3.3.3. Mantenimiento de la línea celular SHSY-5Y.

La línea celular de neuroblastoma humano SHSY-5Y se originó en 1970 a partir de un neuroblastoma metastásico con niveles moderados de actividad beta dopamina hidroxilasa [62], y a partir de su establecimiento, ha sido ampliamente utilizada en diferentes ensayos *in vitro* que buscan evaluar los efectos de sustancias neurotóxicas tales como 24-hidroxicolesterol [63], péptido beta-amiloide [64], 6-hidroxidopamina [65], H₂O₂ [45], entre otras. La gran mayoría de estas células es diploide, y posee características noradrenérgicas, ya que sintetizan y almacenan noradrenalina, cuya secreción está mediada por el ion Ca²⁺, en respuesta a estímulos despolarizantes, muscarina, nicotina y bradicinina [66]. Estas células poseen canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje de los subtipos L y N, y además, mediante mecanismos acoplados a fosfolipasa C e IP₃, poseen la capacidad de liberar Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico [67].

Para el desarrollo de esta investigación, las células SHSY-5Y fueron obtenidas en un vial criopreservado, el cual fue descongelado en proceso inicial de calentamiento rápido, utilizando un baño maría precalentado a 38°C. A continuación, las células descongeladas se disolvieron en un tubo falcon con 5 ml de medio DMEM/F-12 suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico, y posteriormente el tubo se centrifugó a 1200rpm durante 7 minutos. El pellet de células obtenido, fue resuspendido en 5ml de medio fresco y sembrado en una caja T25 para cultivo celular.

Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante un periodo de 7 días, tiempo durante el cual, se observó un crecimiento exponencial de la capa celular hasta obtener una confluencia de 90% de células adheridas a la superficie de la caja. Una vez obtenida la confluencia deseada, las células fueron desprendidas de la caja utilizando 500µl de tripsina- EDTA al 0.25%. Posteriormente, las células desprendidas se centrifugaron en medio fresco, se resuspendieron en 15 ml de medio suplementado y se sembraron en una caja T75 para cultivo celular. Al finalizar la etapa de escalamiento de las células, estas fueron utilizadas para diseñar los experimentos utilizados en la evaluación de las diferentes muestras de propóleos.

3.3.4. Adición de las muestras de propóleos

Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 9×10^4 células por pozo, en 500µl de medio DMEM/F-12 suplementado con 10% de SFB y 1% de mezcla de antibiótico. Posteriormente, se seleccionaron grupos de 3 pozos para evaluar las concentraciones descritas para cada uno de los extractos de propóleos (70% y 96%). Para asegurar la inocuidad del vehículo alcohólico empleado en los propóleos, sobre la viabilidad celular, se realizó un experimento independiente donde se adicionaron por triplicado, los volúmenes más altos de cada etanol empleado en la dilución de los propóleos (933µl, 929µl, 928µl). Los resultados con prueba MTT no mostraron diferencias significativas entre el grupo control y los volúmenes evaluados ($p \geq 0.05$). De esta manera, se lograron obtener 3 repeticiones para las concentraciones de 50µM, 1µM, 100ng, 1ng, 100 pg y 1 pg, de cada muestra agrupadas por regiones geográficas. Posteriormente las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂ durante un periodo de 24 horas.

3.3.5 Tratamientos con H₂O₂ y KCl

Transcurridas las 24 horas de incubación con las diferentes concentraciones de propóleos, se establecieron tres grupos de evaluación: un control de sobrevivencia celular basal, y dos grupos de tratamientos con los citotóxicos, uno con 25Mm de KCl, y otro con 1μM de H₂O₂. Se realizaron como mínimo, 3 repeticiones de cada uno de los experimentos, y posteriormente, las placas se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante un periodo de 24 horas.

3.3.6 Determinación de la viabilidad celular

La posibilidad de realizar cultivos celulares *in vitro* de líneas establecidas, ha permitido profundizar el conocimiento sobre el crecimiento, viabilidad y citotoxicidad en líneas celulares, mediante distintos tipos de evaluación directos e indirectos, destacando entre ellos los métodos colorimétricos usados en placas de microaglutinación, como son los que emplean el MTT. En los ensayos con MTT, se utiliza la sal del MTT (bromuro 3-(4,5 dimetiltiazol 2-il)-2,5 difetil- tetrazolio), porque en eucariotas, la enzima mitocondrial succinatodeshidrogenasa, puede reducir el MTT soluble y amarillo, convirtiéndolo en un producto azul intenso e insoluble (MTT formazán) [68], cuya presencia bajo el microscopio, sirve de indicador de viabilidad o muerte celular.

En el presente trabajo, la viabilidad celular en los pozos control y en los pozos tratados con los citotóxicos H₂O₂ y KCl, y con las diferentes concentraciones de cada muestra de propóleo, se determinó utilizando el ensayo colorimétrico de MTT (Thiazolyl Blue TetrazoliumBromide). Este ensayo consiste en la adición a cada pozo sin medio, de 100μl de reactivo MTT previamente disuelto en un Buffer de Solución Salina o PBS estéril (5mg de MTT/ml de PBS). Posteriormente, la placa se deja en incubación a 37°C y 5% de CO₂, durante un periodo de dos horas. Transcurrido este lapso de tiempo, se retira el MTT y se adicionan 200μl de DMSO en cada pozo, esto con el objeto de solubilizar las sales de formazán. Finalmente, las placas se incuban nuevamente por un periodo de 30 minutos, tras el cual se puede determinar la reducción de sales de formazán empleando un espectrofotómetro, y leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 492nm [69].

Otro ensayo para evaluación de viabilidad celular es la medición de la liberación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH), el cual consiste en determinar la liberación de la

LDH al medio extracelular, debido a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. La LDH celular participa en la conversión de lactato a piruvato, generando poder reductor (NADH/H⁺), que se aprovecha por una diaforasa para transformar la sal de tetrazolio amarilla, en una sal de formazán soluble y de color rojo (absorción máxima a 490 nm).

En nuestro trabajo, el reactivo utilizado para la medición de LDH, fue el CytoTox-ONE™ de Promega (Cat. G7890), y el protocolo de la técnica fue realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Figura 3-1).

3.3.7 Análisis Estadístico

Los datos son presentados como el $\bar{X} \pm D.E$ de mínimo, 3 experimentos independientes. La comparación estadística se realizó con Análisis de Varianza de Una Vía (ANOVA), seguida de una prueba de comparación de media de Dunnett, utilizando el programa informático GraphPadPrism versión 5.0. Se consideró $P \leq 0.05$ como valor estadísticamente significativo.

3.4 Resultados

3.4.1 Efecto de propóleos colombianos ante neurotoxicidad inducida por H₂O₂

Después de estandarizar la concentración de H₂O₂ necesaria para provocar un porcentaje de mortalidad celular entre el 40-60% en células SH-SY5Y indiferenciadas, los resultados indicaron que una concentración de 1 μ M de H₂O₂ diluido en medio DMEM-F12, provocaba la mortalidad deseada (40-60%). A partir de este dato se estableció un control de muerte frente al cual se realizó la comparación con cada dosis de propóleo.

De acuerdo con los datos obtenidos a partir del MTT de las muestras agrupadas por regiones geográficas (Tablas II, III, IV), observamos que la viabilidad de células SH-SY5Y expuestas a diferentes concentraciones de propóleos diluidos en etanol al 70%, no presentó diferencias significativas entre el control de muerte con 1 μ M de H₂O₂, y las diferentes concentraciones de propóleos. Además, la leve recuperación de la viabilidad celular en el grupo de propóleos de la Sierra Nevada de Santa Marta, a concentraciones

de 1ng/500µl, no presenta diferencia significativa en comparación con el control de muerte por H₂O₂.

De igual manera, la evaluación de las mismas muestras diluidas en etanol al 96%, mostró ausencia de recuperación en la viabilidad celular ($p \geq 0.05$) (Figuras 3-2, 3-3, 3-4).

También se observó que los propóleos del Valle del Cauca, a concentraciones de 100ng y 1pg, provocaron una leve disminución del porcentaje de supervivencia, al igual que las concentraciones de 100ng de propóleos boyacenses ($*p \leq 0.05$).

3.4.2 Efecto de propóleos colombianos frente neurotoxicidad inducida por KCl

De acuerdo con experimentos previamente realizados, una concentración de 25µM de Cloruro de Potasio (KCl) provoca disminución de 40-60% en la viabilidad celular de la línea SHSY-5Y indiferenciada, por lo cual, nuestro control de muerte para la evaluación del efecto neuroprotector de los propóleos, fue KCl a dosis de 25µM.

La evaluación de la viabilidad celular fue realizada con el método de tinción MTT y los datos obtenidos indicaron que los propóleos colombianos obtenidos de las regiones geográficas seleccionadas y con etanol al 70% como vehículo, no presentan un efecto neuroprotector frente a los estímulos citotóxicos inducidos por el KCl en células SH-SY5Y ($p \geq 0.05$) (Figuras 3-5, 3-6, 3-7). Los propóleos originarios del Altiplano Cundiboyacense, a una concentración de 50µM/500µl, mostraron una diferencia significativa en comparación con el control ($*p \leq 0.05$). Esta diferencia indica una disminución del número de células vivas expuestas al KCl, y de células con KCl expuestas a esta concentración de propóleos.

Al igual que los extractos etanólicos al 70%, los extractos al 96% tampoco mostraron una recuperación de la viabilidad celular. Las concentraciones evaluadas no presentaron diferencias significativas en comparación con los controles de muerte por KCl (límite de confianza 95%). Además, se observó que las concentraciones entre 100 ng y 1pg de propóleos boyacenses, de manera poco significativa, pueden disminuir la viabilidad celular. Esto también se observó en propóleos de la Sierra Nevada de Santa Marta, a concentraciones de 100pg y 1pg ($*p \leq 0.05$) (Figuras 3-8, 3-9, 3-10).

3.4.3. Evaluación de la viabilidad celular utilizando el método de cuantificación de liberación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH)

De acuerdo con los datos de viabilidad celular obtenidos a partir de los ensayos con el método de tinción MTT, y a pesar de no encontrar diferencias significativas, se decidió utilizar la prueba de la enzima LDH para reevaluar concentraciones específicas de 2 muestras del Altiplano Cundiboyacense (muestras 104 y 146), cuyos porcentajes de viabilidad o neuroprotección, fueron un poco superiores en comparación con los controles de muerte por KCl ($*p \leq 0.05$) (Figura 3-11). Adicionalmente, el Propóleo Verde de Brasil permitió establecer un control positivo para las muestras colombianas que fueron seleccionadas en la evaluación de citotoxicidad por la prueba de LDH.

Los resultados indicaron que concentraciones de 100ng, 100pg y 1pg de los propóleos 104 y 146 diluidos en etanol 70%, no presentan diferencias significativas con respecto al control de muerte con 25 μ M de KCl en células SHSY-5Y (Figura 3-12). La hipótesis de neuroprotección fue validada con un análisis ANOVA, seguido de la prueba Dunnett para comparación de medias ($p \geq 0.05$).

3.4.4. Comparación propóleos colombianos con propóleo verde de Brasil.

Una muestra comercial de propóleo verde de Brasil fue empleada para la evaluación de la citotoxicidad provocada por KCl en la línea SHSY-5Y. Se establecieron los siguientes grupos de evaluación: un grupo control de sobrevivencia celular basal, un grupo de control de muerte por KCl y 6 grupos de tratamiento con concentraciones decrecientes de propóleo verde (50 μ g, 1 μ g, 100ng, 1ng, 100pg, 1pg). La evaluación de la citotoxicidad se realizó con el uso de la prueba LDH, a través de la cual se logró establecer una ausencia de efecto neuroprotector de las concentraciones seleccionadas en este estudio. El porcentaje de células vivas en comparación con las células tratadas con KCl, presenta un claro aumento en el porcentaje de citotoxicidad ($p \leq 0.05$), y la combinación del citotóxico con las diferentes dosis de propóleo verde, no presenta una recuperación significativa de la viabilidad celular (Figura 3-13) ($p \geq 0.05$).

De acuerdo con los datos obtenidos a partir de la evaluación de los propóleos Cundiboyacenses que mostraron un menor efecto citotóxico ante la acción del KCl (P104, P146), nosotros decidimos considerar estos propóleos como muestras representativas en

nuestro estudio, para así, lograr establecer una comparación entre la citotoxicidad de propóleos colombianos y propóleo verde de Brasil.

Las variaciones en el porcentaje de citotoxicidad observado en las muestras de propóleos número 104 y 146, fueron comparadas con los datos obtenidos del propóleo verde de Brasil (Figura 3-14) y los resultados sugieren que en un contexto de citotoxicidad por KCl, los propóleos colombianos y el verde, actúan de manera similar sobre el porcentaje de citotoxicidad, y ninguno de los propóleos evaluados a diferentes dosis, es capaz de proteger a las células de una manera significativa, frente a la acción citotóxica del KCl.

3.5 Discusión

Existen varias limitaciones técnicas y conceptuales que subyacen al desarrollo de tratamientos efectivos, capaces de evitar la progresión de los signos clínicos y/o de prevenir el desarrollo de neurodegeneraciones asociadas al envejecimiento, como la EA y la EP [5, 70, 71].

No obstante, la identificación de algunos de los mecanismos moleculares involucrados en esta clase de enfermedades, ha conducido a un creciente interés sobre el papel de los Radicales Libres, el Estrés Oxidativo (EO), y la sobrecarga de calcio durante el inicio y desarrollo de tales neuropatías [29, 31, 15, 72-77].

La exposición de células neuronales a concentraciones elevadas de sustancias prooxidantes como el H_2O_2 , genera alteraciones fisiológicas y estructurales que comprometen los mecanismos de supervivencia celular. La reproducción *in vitro* de esta condición es una herramienta de investigación ampliamente utilizada en estudios de neuroprotección y/o neurodegeneración, ya que los radicales libres y sus efectos, son considerados como blanco terapéutico en algunos tratamientos antioxidantes empleados en el manejo de EN como la EA y la EP [4].

En este sentido, el uso de antioxidantes como sustancias capaces de proteger a las neuronas durante los estados prooxidantes asociados a la neurodegeneración, ha sido un tema ampliamente estudiado, donde se han incluido reportes interesantes sobre algunas sustancias de origen natural como las vitaminas C y E, el β -caroteno, la coenzima Q, el ascorbato y los polifenoles [78-81].

Los polifenoles son potentes recicladores de prooxidantes o radicales como el superóxido, peróxido y oxígeno [82-84], además, numerosos estudios en diferentes modelos de neurodegeneración *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que pueden prevenir y/o reducir el daño oxidativo generado por los radicales libres [55-57]. De hecho, los efectos neuroprotectores de los polifenoles se han hecho evidentes en numerosos análisis epidemiológicos que han establecido una clara relación entre estos efectos, y la disminución del riesgo a la disfunción neurológica asociada al envejecimiento [58, 85, 86].

La elevada concentración de polifenoles encontrados en los propóleos [87], ha permitido que algunos autores planteen el uso de estos productos como una opción terapéutica de acción antioxidante, ante el desarrollo de neurodegeneraciones como la EA y la EP [45], por lo tanto, el interés de este estudio se basó en el conocimiento de la posible capacidad neuroprotectora de los propóleos de origen Colombiano.

En nuestro estudio, la exposición de células SHSY-5Y a 1 μ M de H_2O_2 fue empleada como un modelo de neurodegeneración *in vitro*, en el que se evaluó la capacidad citoprotectora y antioxidante de los propóleos colombianos. De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de la prueba de tinción MTT, nuestros datos sugieren que los propóleos colombianos procedentes de las regiones del Altiplano Cundiboyacense, la Sierra Nevada de Santa Marta y del Valle del Cauca, no presentan un efecto neuroprotector-antioxidante significativo en células SHSY-5Y indiferenciadas, ante la acción del H_2O_2 ($p \geq 0.05$), lo cual podría sugerir en primera medida, que las muestras evaluadas no contienen una cantidad suficiente de polifenoles con capacidad citoprotectora. No obstante, es necesario conocer la correlación existente entre la composición fenólica de los propóleos evaluados, y su actividad antioxidante [88], para así, poder considerar a la concentración fenólica como factor responsable de la ausencia de capacidad neuroprotectora-antioxidante de los propóleos evaluados.

Por otro lado, es posible considerar que la capacidad antioxidante de los propóleos pueda ser ejercida a través de mecanismos como el secuestro de radicales libres y/o el potenciamiento de los sistemas antioxidantes intraneuronales, no obstante, debido a la ausencia de citoprotección en nuestro estudio, resulta válido preguntar: ¿Hasta dónde la capacidad antioxidante de tales mecanismos, son capaces de proveer protección en neuronas expuestas a H_2O_2 ?

Además de la ausencia de protección, algunos datos obtenidos con la prueba de tinción con MTT, indicaron que las concentraciones entre 100ng y 1pg de propóleos del Altiplano Cundiboyacense y del Valle de Cauca, diluidas en etanol al 96%, y expuestas a 1 μ M de H₂O₂, disminuyeron de manera leve, el porcentaje de viabilidad celular, en comparación con los controles de muertes ($*p\leq 0.05$) (Figuras 3-2, 3-3).

Esta leve disminución de la viabilidad celular podría ser atribuida a un posible efecto citotóxico de los propóleos empleados a las concentraciones previamente descritas, sin embargo, no existen reportes previos acerca de la citotoxicidad de propóleos, que puedan confirmar o no esta teoría. Además, en caso de existir algún efecto citotóxico, se esperaría observar el mismo en concentraciones superiores a 100ng de los propóleos.

Siendo este efecto producido a concentraciones mínimas de propóleos (100ng-1pg), es posible considerar que algunos factores técnicos como el número de células, o los volúmenes de H₂O₂, hayan influido de manera directa sobre el porcentaje de viabilidad celular en estos experimentos.

Al igual que las muestras de propóleos evaluadas en células expuestas a H₂O₂, las células SHSY-5Y expuestas a KCl tampoco mostraron una recuperación significativa de la viabilidad celular ($p\geq 0.05$).

De acuerdo con algunos autores, la exposición de neuronas a altas concentraciones de potasio extracelular, puede conducir a un aumento de la despolarización celular que puede inducir a la muerte por un mecanismo dependiente de Ca²⁺ [89], donde el incremento intracelular de Ca²⁺ dado por la apertura de canales de calcio, puede provocar un aumento excesivo del flujo de este catión, hacia citoplasma, afectando la función mitocondria y reticular (entre otras), lo que a su vez, incrementa la producción de Especies Reactivas de Oxígeno [89, 90].

En este sentido, las células expuestas a KCl pueden ser lesionados por los mecanismos de sobrecarga de calcio, y/o de EO, por lo tanto, la adición de propóleos podría hacer blanco sobre una o varias de las vías implicadas en estos mecanismos de muerte por KCl. No obstante, la ausencia de recuperación de la viabilidad celular podría sugerir, en primera instancia, una capacidad insignificante de los propóleos para disipar la producción de especies reactivas durante el proceso de muerte por sobrecarga de calcio inducida por exposición a concentraciones de KCl extracelular.

Por otro lado, reportes anteriores indican que algunos polifenoles pueden poseer la capacidad de activar o inhibir varias vías de señalización intracelular como NF- κ B, SIRT1, MAPK's, proteínas de shock calórico y varias otras moléculas reguladoras, además, cada una de estas moléculas de señalización posee un papel importante en funciones básicas como la senescencia, la apoptosis y la activación o producción de factores de transcripción [91]. Debido a la falta de recuperación de la viabilidad en células SHSY-5Y expuestas a KCl y propóleos, es posible considerar que el potencial antioxidante de los polifenoles contenidos en las muestras de propóleos colombianos, quizá no es un mecanismo suficiente para la activación de vías de señalización necesarias para la supervivencia y proliferación de células neuronales que sobreviven a la citotoxicidad por KCl.

Resultados adicionales de la evaluación MTT de propóleos expuestos a KCl, indicaron que algunas concentraciones de propóleos provocaron cambios mínimos de la viabilidad, en comparación con los controles de muerte.

Concentraciones entre 100ng y 1pg de propóleos boyacenses y de la Sierra Nevada de Santa Marta al 96%, mostraron una disminución de la viabilidad celular ($*p \leq 0.05$) cuando fueron expuestas a 25mM de KCl (Figura 3-10). Además, las concentraciones cercanas a 50 μ g de propóleos del Altiplano Cundiboyacense, diluidas en etanol al 70%, también disminuyeron el porcentaje de la viabilidad en células SHSY-SY ($*p \leq 0.05$), en comparación con el control de muerte por KCl (50.5 ± 8.9 vs 45.7 ± 8.2) (Figura 3-5). Al igual que para los propóleos expuestos a H_2O_2 , es posible que esta disminución de la viabilidad pueda ser relacionada con variaciones técnicas relacionadas con la población celular, o los volúmenes de KCl.

De manera opuesta, dos muestras específicas de propóleos originarios del Altiplano Cundiboyacense, y diluidos en etanol al 96% (Nº 104 y 146), mostraron un leve aumento de la viabilidad en células expuestas a KCl (Figura 3-11). Este incremento de la supervivencia celular fue observado a concentraciones de 100ng, 100pg y 1pg, y los datos obtenidos a partir de la evaluación con MTT, indicaron que se obtuvo una pequeña recuperación de la viabilidad celular en comparación con el control de muerte por KCl ($*p \leq 0.05$). De manera particular, estas concentraciones corresponden con algunas muestras de propóleos que provocaron disminución de la viabilidad.

Estudios previos en propóleos boyacenses, han mostrado una concentración considerable de polifenoles tipo flavonoides en esta clase de muestras [88], por lo tanto, sería posible considerar que, en particular, las muestras número 104 y 146 incluidas en este estudio, fueron obtenidas de zonas boyacenses con una amplia variedad botánica, por lo tanto, estas muestras podrían contener una cantidad de polifenoles superior, en comparación con las muestras obtenidas de otras zonas del Altiplano Cundiboyacense. En este sentido, es válido considerar que la actividad citoprotectora de las muestras 104 y 146, podría ser el resultado de una alta concentración de flavonoides con capacidad antioxidante.

Adicionalmente, es probable considerar que las muestras 104 y 146 pudieran proteger a algunas células de las alteraciones iniciales dados por la citotoxicidad por KCl. Es decir, teniendo en cuenta que el incremento sostenido en las concentraciones de calcio citosólico provoca activación de fosfolipasas, endonucleasas, proteasas, y de la Óxido Nítrico Sintasa, todas ellas implicadas en la ejecución de programas de muerte celular [37, 38, 92, 93], es importante considerar que una de las primeras barreras de protección celular que es lesionada por la exposición a KCl, es la membrana celular, por lo tanto, las alteraciones membranales provocan disminución en la fluidez, reducción en el potencial electroquímico, y aumento de la permeabilidad de la membrana, lo que podría relacionarse con lesiones mitocondriales y del citoesqueleto, lo que podría ser consideradas como uno de los factores iniciadores de la muerte neuronal. De esta manera, es posible considerar que los polifenoles de las muestras evaluadas, podrían haber potenciado los mecanismos antioxidantes membranales o transmembranales (i.e α -secretasa) [91], en aquellas células que no fueron totalmente lesionadas por la exposición previa a KCl.

En este sentido, la leve recuperación de la supervivencia de células SHSY-5Y expuestas a las muestras 104 y 146 de propóleos y KCl, podría ser el resultado del mejoramiento de los mecanismos antioxidantes membranales, por la acción de los polifenoles. Esto pudo haber permitido que algunas células vivas adquirieran un pequeño grado de resistencia a las condiciones del medio extracelular, y por lo tanto, podrían, además de sobrevivir, continuar con su ciclo de crecimiento *in vitro*.

Así mismo, es acertado sugerir que los resultados obtenidos con la técnica de tinción con MTT, indicaron un efecto relativamente positivo de citoprotección con las muestras 104 y 146, posiblemente, por la acción antioxidante de los polifenoles sobre la membrana celular, aunque ese mismo efecto no signifique en sí mismo, una reducción realmente importante de la mortalidad celular.

Otro de los blancos celulares a considerar en este caso de citoprotección, son los canales de calcio. Como se mencionó anteriormente, la exposición a KCl provoca despolarización celular con la consecuente entrada de calcio a través de canales tipo L, lo que resulta en una sobrecarga de calcio intracelular capaz de conducir a la muerte neuronal. Bajo este contexto, se pudo inferir sobre una posible relación de estos propóleos, con los mecanismos responsables del bloqueo de canales de calcio, que permita a algunas células, conservar sus condiciones de homeostasis.

Adicionalmente, debido a que estas muestras estaban diluidas en etanol al 96%, se consideraron las disminuciones de la viabilidad celular provocada por otras muestras diluidas a esta misma concentración, y se planteó la posibilidad de que las diluciones de propóleos en etanol al 96%, posiblemente permitan mejorar la capacidad citoprotectora de los propóleos.

Los datos de neuroprotección obtenidos con la técnica MTT en las muestra 104 y 146 de propóleos del Altiplano Cundiboyacense, fue reevaluada con la prueba de cuantificación de la liberación de enzima LDH, una técnica de viabilidad celular más específica que la prueba de MTT. Para este experimento se incluyó un control positivo de neuroprotección con una muestra comercial de propóleo verde de Brasil, empleado a concentraciones similares a las descritas en estudios previos [45].

Los resultados indicaron la ausencia total de cualquier capacidad citoprotectora (Figura 3-12), ya que no se observó una diferencia significativa entre las células tratadas con los propóleos (100ng, 100pg y 1pg), y los controles de citotoxicidad por KCl ($p \geq 0.05$).

En este sentido, resulta válido caracterizar a los propóleos colombianos por su ausencia de capacidad citoprotectora en los modelos empleados en nuestro estudio.

En comparación con el propóleo verde de Brasil, nuestro estudio sugiere que los propóleos Colombianos presentan efectos similares ante la exposición con KCl a concentraciones de 25 μ M, es decir que en nuestro modelo de investigación, la viabilidad

celular y la citotoxicidad, son variables que no presentan diferencias significativas cuando son comparadas con las células expuestas, de manera única, al citotóxico KCl. Además, nuestros resultados no son coincidentes con los reportes previos de neuroprotección atribuida a algunos propóleos, como el propóleo verde de Brasil [45], por lo tanto, sería posible considerar que las muestras evaluadas contenían una concentración poco considerable de polifenoles.

3.6 Conclusiones

El papel del estrés oxidativo y los antioxidantes en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas de tipo progresivo, ha dado cabida al desarrollo de investigaciones orientadas al estudio del potencial neuroprotector de diversas sustancias de origen natural, como el propóleo. En nuestro estudio, evaluamos la capacidad neuroprotectora de propóleos de origen colombiano, y los resultados sugieren que es posible la existencia de alguna relación entre el efecto de los propóleos, y diversas vías de muerte/supervivencia celular, sin embargo, es evidente que ante la exposición de sustancias como el H_2O_2 y el KCl, las posibles bondades de los propóleos colombianos no son significativas, ya que no mostraron una recuperación de la viabilidad celular en la línea SHSY-5Y indiferenciadas. No obstante, debido a la complejidad, tanto de los propóleos, como de los mecanismos de muerte celular inducidos por la exposición de células neuronales a H_2O_2 y el KCl, es importante reconocer la necesidad del desarrollo de nuevos estudios *in vitro* e *in vivo* que aporten mayores conocimientos y diferente perspectivas sobre el uso de los propóleos colombianos como posibles agentes terapéuticos en el manejo de EN como la EA y la EP.

Tablas

Tabla II. Efecto de los propóleos del Altiplano Cundiboyacense, sobre la viabilidad de células SHSY-5Y expuestas a H₂O₂

Tratamientos	Viabilidad Celular
Basal	100.00±2.51***
Control H ₂ O ₂	45.69±1.64
Propóleo 50µg/0.5ml	40.82±1.55
Propóleo 1µg/0.5ml	44.33±2.39
Propóleo 100ng/0.5ml	41.04±1.67
Propóleo 1ng/0.5ml	42.10±1.53
Propóleo 100pg/0.5ml	43.28±1.70
Propóleo 1pg/0.5ml	42.82±1.71

Tabla II. Células SHSY-5Y indiferenciadas fueron expuestas a concentraciones decrecientes de 8 muestras de propóleos diluidas en etanol al 70%. A continuación, se adicionó 1µM de H₂O₂ durante 24 h. La viabilidad celular fue evaluada adicionando 5mg/ml del reactivo MTT y posterior incubación durante 2h. La fluorescencia fue medida a una D.O de 492nm. Los valores representan la media ± D.E de mínimo 3 experimentos independientes de cada muestra. $P \geq 0.05$.

Tabla III. Efecto de los propóleos del Valle del Cauca sobre la viabilidad de células SHSY-5Y expuestas a H₂O₂

Tratamientos	Viabilidad Celular
Basal	100±3.99***
Control H ₂ O ₂	43.83±3.31
Propóleo 50µg/0.5ml	41.69±2.95
Propóleo 1µg/0.5ml	42.63±3.06
Propóleo 100ng/0.5ml	40.55±3.02
Propóleo 1ng/0.5ml	41.48±2.84
Propóleo 100pg/0.5ml	42.96±3.04
Propóleo 1pg/0.5ml	40.75±2.82

Tabla III. Células SHSY-5Y indiferenciadas fueron expuestas a concentraciones decrecientes de 7 muestras de propóleos diluidas en etanol al 70%. A continuación, se adicionó 1µM de H₂O₂ durante 24 h. La viabilidad celular fue evaluada adicionando 5mg/ml del reactivo MTT y posterior incubación durante 2h. La fluorescencia fue medida a una D.O de 492nm. Los valores representan la media ± D.E de mínimo 3 experimentos independientes de cada muestra. $P \geq 0.05$.

Tabla IV. Efecto de los propóleos de la Sierra Nevada de Santa Marta sobre la viabilidad de células SHSY-5Y expuestas a H_2O_2

Tratamientos	Viabilidad Celular
Basal	100±2.66***
Control H_2O_2	45.74±2.44
Propóleo 50µg/0.5ml	43.77±2.52
Propóleo 1µg/0.5ml	45.35±2.66
Propóleo 100ng/0.5ml	44.23±2.22
Propóleo 1ng/0.5ml	48.94±2.29
Propóleo 100pg/0.5ml	43.25±21.41
Propóleo 1pg/0.5ml	41.37±3.11

Tabla IV. Células SHSY-5Y indiferenciadas fueron expuestas a concentraciones decrecientes de 11 muestras de propóleos diluidas en etanol al 70%. A continuación, se adicionó $1\mu M$ de H_2O_2 durante 24 h. La viabilidad celular fue evaluada adicionando 5mg/ml del reactivo MTT y posterior incubación durante 2h. La fluorescencia fue medida a una D.O de 492nm. Los valores representan la media \pm D.E de mínimo 3 experimentos independientes de cada muestra. $P \geq 0.05$.

Figuras

Figura 3-1. Reacción MTT.

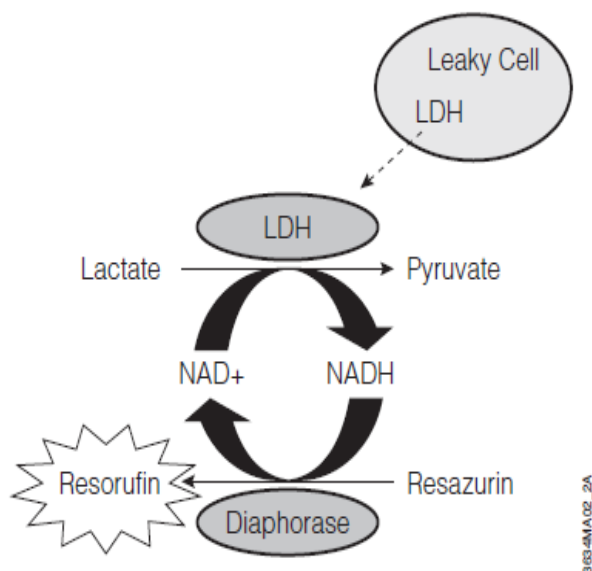


Figura 3-1. La liberación de LDH generada por daño celular, es medida a partir del aumento de lactato NAD^+ y resazurín, como sustratos en presencia de diaforasas. La generación del resofurín fluorescente, producto del incremento de los sustratos, es proporcional a la cantidad de LDH. (Tomado de Technical Bulletin of PROMEGA®, 2009).

Figura 3-2. Evaluación de supervivencia en células expuestas a propóleos boyacenses al 96% y H₂O₂.

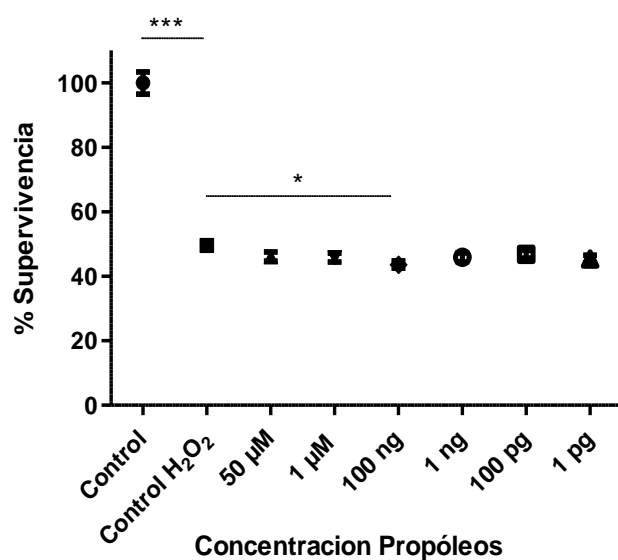


Figura 3-2. Células SHSY-5Y fueron expuestas a 1µM de H₂O₂ y 24 horas después, fueron tratadas con concentraciones decrecientes de propóleos del Altiplano Cundiboyacense diluidos en etanol al 96%. El efecto sobre la viabilidad celular fue evaluado con el método MTT. Los resultados representan la media ± SEM de experimentos independientes. $P \leq 0.05$ vs control de muerte (Control H₂O₂).

Figura 3-3. Evaluación de supervivencia en células expuestas a propóleos del Valle del Cauca al 96% y H₂O₂.

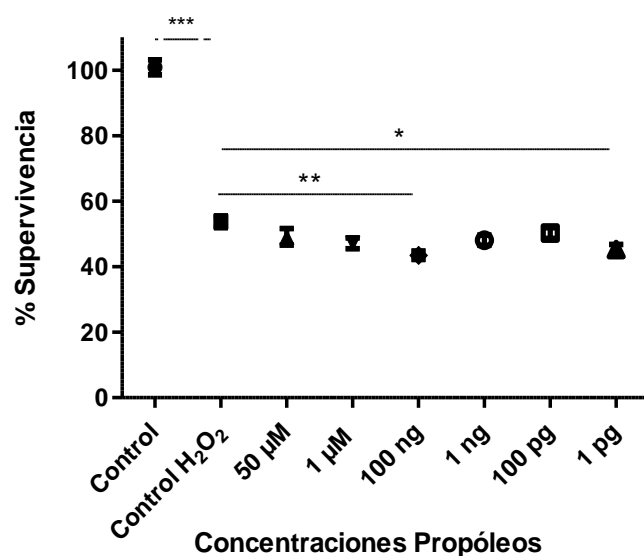


Figura 3-3. Células SHSY-5Y fueron expuestas a 1µM de H₂O₂ y 24 horas después, fueron tratadas con concentraciones decrecientes de propóleos del Valle del Cauca diluidos en etanol al 96%. El efecto sobre la viabilidad celular fue evaluado con el método MTT. Los resultados representan la media ± SEM de experimentos independientes. $P \geq 0.05$ vs control de muerte (Control H₂O₂).

Figura 3-4. Evaluación de supervivencia en células expuestas a propóleos de la Sierra Nevada de Santa Marta al 96% y H₂O₂.

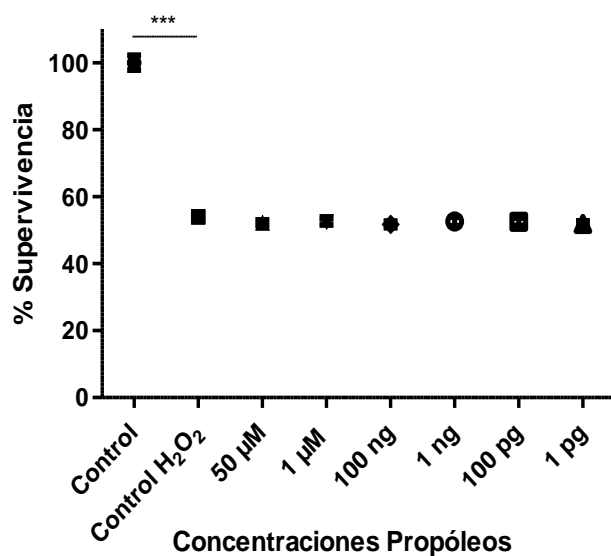


Figura 3-4. Células SHSY-5Y fueron expuestas a 25µM de KCl y 24 horas después, fueron tratadas con concentraciones decrecientes de propóleos de la Sierra Nevada de Santa Marta diluidos en etanol al 96%. El efecto sobre la viabilidad celular fue evaluado con el método MTT. Los resultados representan la media \pm SEM de experimentos independientes. $P \geq 0.05$ vs control de muerte (Control H₂O₂).

Figura 3-5. Evaluación de la viabilidad en células expuestas a KCl y propóleos boyacenses al 70%.

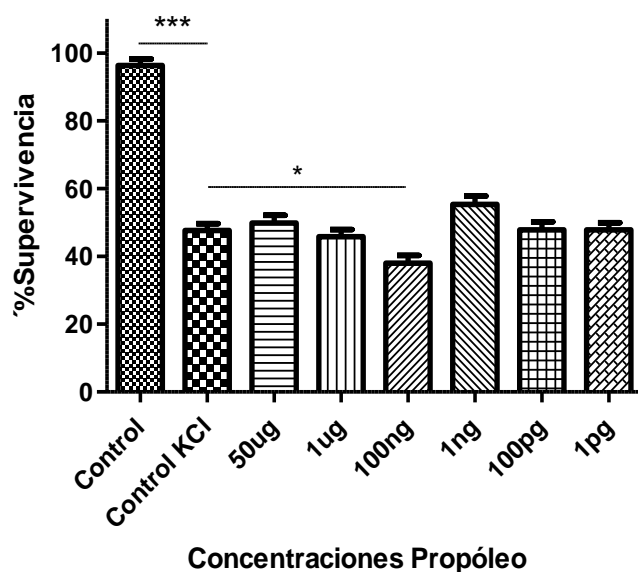


Figura 3-5. Células SHSY-5Y fueron expuestas a 25mM de KCl y 24 horas después, fueron tratadas con concentraciones decrecientes de propóleos del Altiplano Cundiboyacense diluidos en etanol al 70%. El efecto sobre la viabilidad celular fue evaluado con el método MTT. Los resultados representan la media \pm SEM de experimentos independientes. $P \geq 0.05$ vs control de muerte (Control KCl).

Figura 3-6. Evaluación de la viabilidad en células expuestas a KCl y propóleos al 70% del Valle de Cauca.

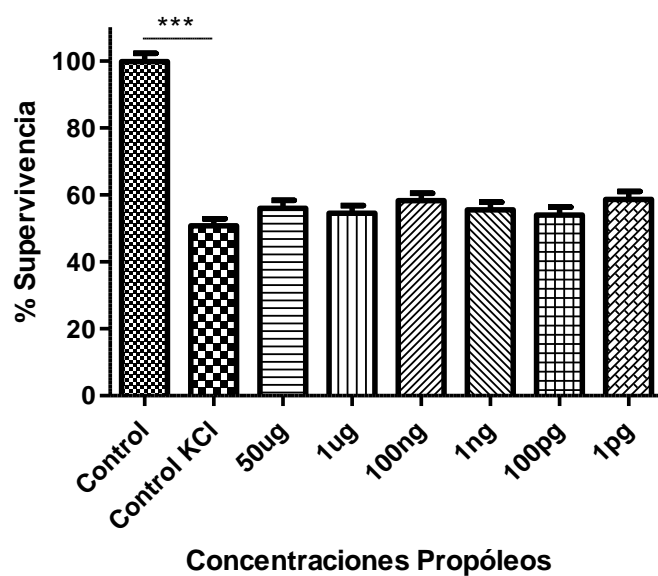
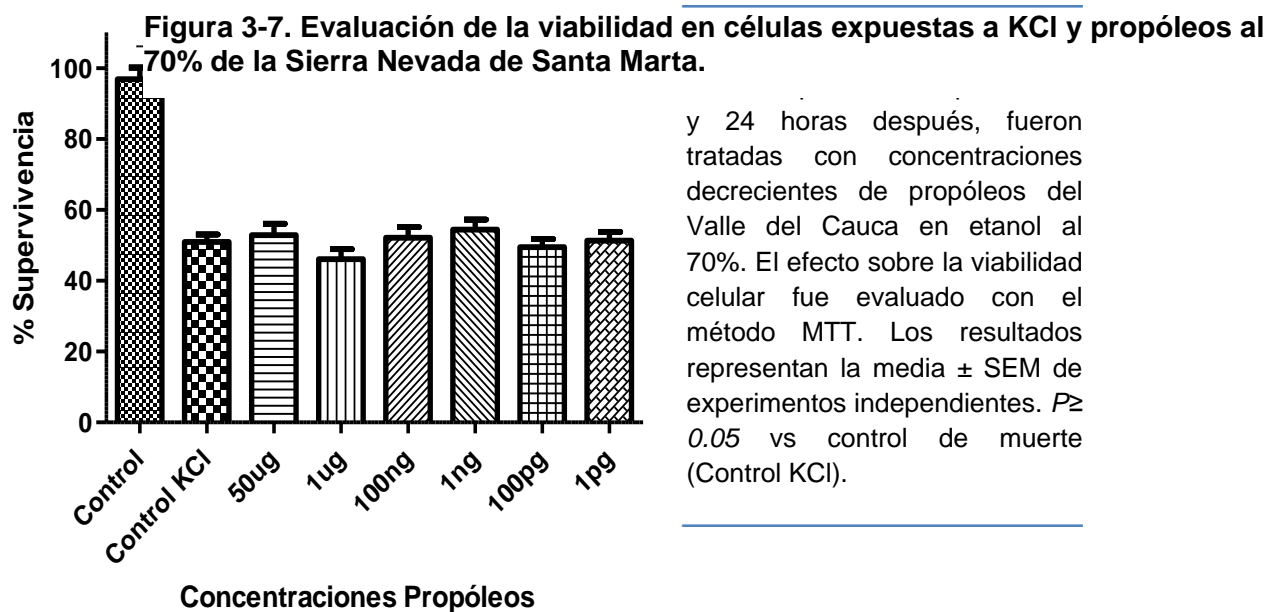


Figura 3-7. Células SH-SY5Y expuestas a 25 μ M de KCl y 24 horas después, fueron tratadas con concentraciones decrecientes de propóleos de la Sierra Nevada de Santa Marta diluidos en etanol al 70%. El efecto sobre la viabilidad celular fue evaluado con el método MTT. Los resultados representan la media \pm SEM de experimentos independientes. $P \geq 0.05$ vs control de muerte (Control KCl).

Figura 3-8. Evaluación de la viabilidad en células expuestas a KCl y propóleos al 96% del Altiplano Cundiboyacense.

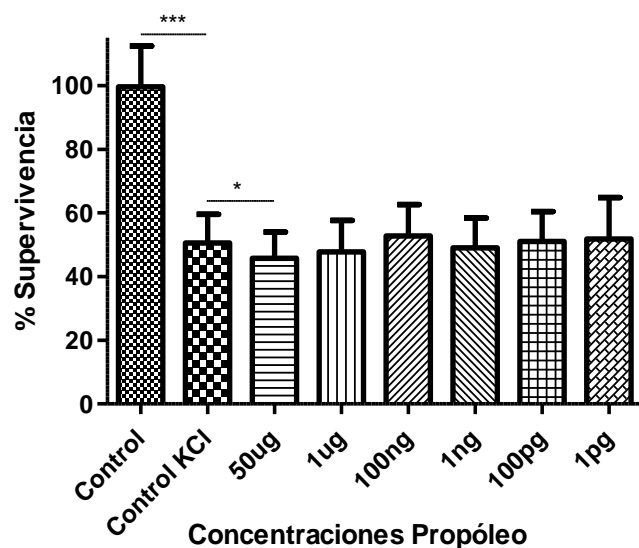


Figura 3-8. Células SH-SY5Y fueron expuestas a 25µM de KCl y 24 horas después, fueron tratadas con concentraciones decrecientes de propóleos boyacenses diluidos en etanol al 96%. El efecto sobre la viabilidad celular fue evaluado con el método MTT. Los resultados representan la media \pm SEM de experimentos independientes. $P \geq 0.05$ vs control de muerte (Control KCl).

Figura 3-9. Evaluación de la viabilidad en células expuestas a KCl y propóleos al 96% del Valle del Cauca.

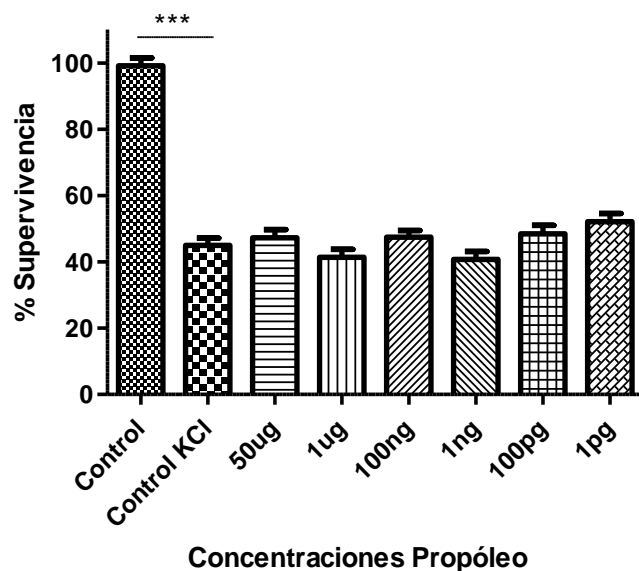


Figura 3-9. Células SH-SY5Y fueron expuestas a 25µM de KCl y 24 horas después, fueron tratadas con concentraciones decrecientes de propóleos del Valle del Cuaca diluidos en etanol al 96%. El efecto sobre la viabilidad celular fue evaluado con el método MTT. Los resultados representan la media \pm SEM de experimentos independientes. $P > 0.05$ vs

Figura 3-110. Evaluación de la viabilidad en células expuestas a KCl y propóleos al 96% de la Sierra Nevada de Santa Marta.

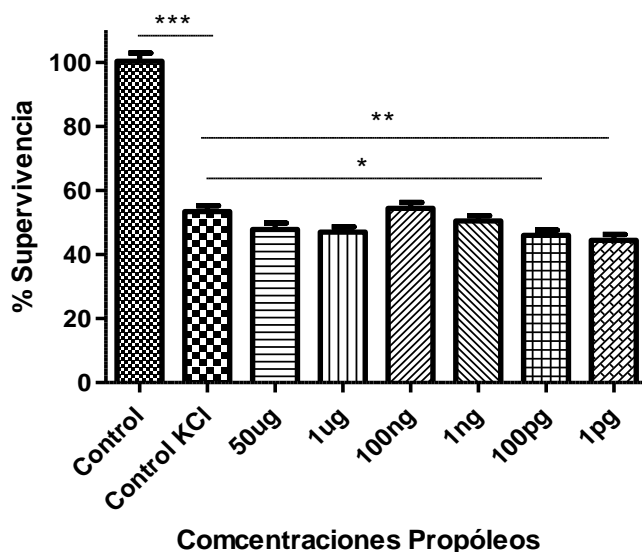


Figura 3-10. Células SH-SY5Y fueron expuestas a 25 μ M de KCl y 24 horas después, fueron tratadas con concentraciones decrecientes de propóleos de la Sierra Nevada de Santa Marta diluidos en etanol al 96%. El efecto sobre la viabilidad celular fue evaluado con el método MTT. Los resultados representan la media + SEM de experimentos

Figura 3-101. Evaluación de la viabilidad con MTT, en células SHSY-5Y expuestas a KCl y muestras N° 104 y 146 de propóleos Cundiboyacenses.

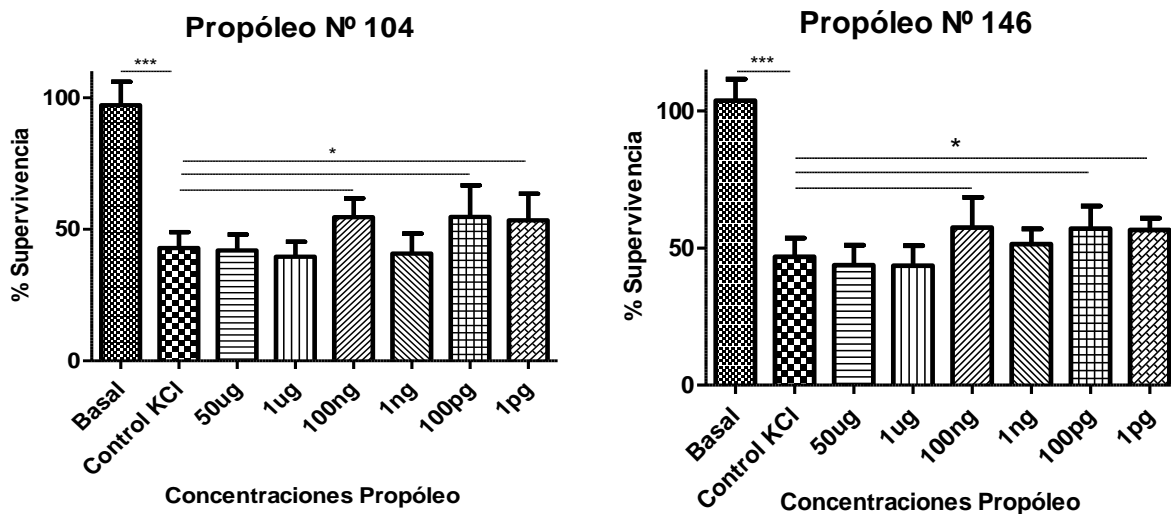


Figura 3-11. Propóleos N° 104 y 146 del Altiplano Cundiboyacense. Las células SHSY-5Y fueron expuestas a 25Mm de KCl, y 24 horas después se adicionaron cada uno de los propóleos. El efecto sobre la viabilidad celular fue evaluado con el método MTT. Los resultados representan la media \pm SEM de experimentos independientes. $P \geq 0.05$ vs control de muerte (Control KCl).

Figura 3-12. Evaluación de la citotoxicidad con LDH en células SHSY-5Y expuestas a propóleos Cundiboyacenses y KCl.

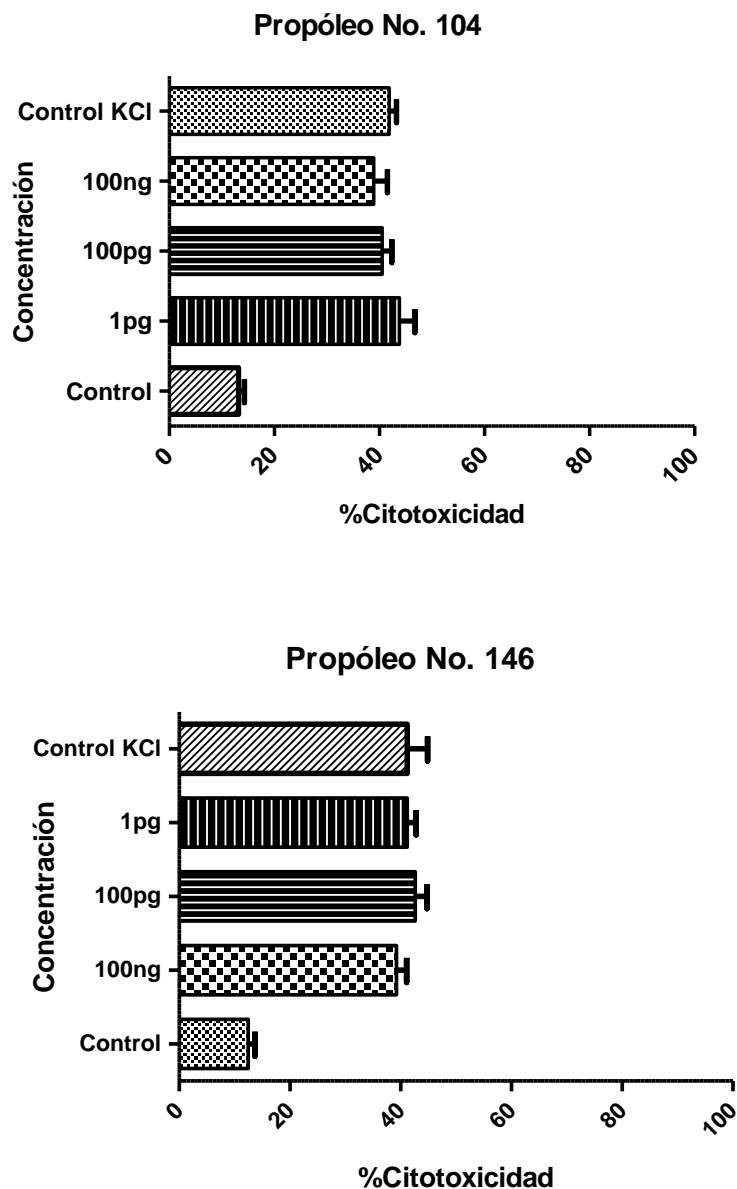


Figura 3-12. Células SHSY-5Y expuestas a propóleos de origen Cundiboyacenses (No. 104 y 146) y 25 μ M de KCl. Se evaluaron dosis de 100ng, 100pg y 1pg para cada propóleo, y el citotóxico KCl a dosis de 25 μ M fue adicionado al medio celular 24h después. El porcentaje de citotoxicidad fue evaluado con el método de cuantificación de la liberación de la enzima LDH, y los resultados representan la media \pm SEM de 8 experimentos independientes. *P < 0.05 vs control de muerte (Control KCl).

Figura 3-13. Células SHSY-5Y expuestas a 25mM de KCl y Propóleo Verde de Brasil.

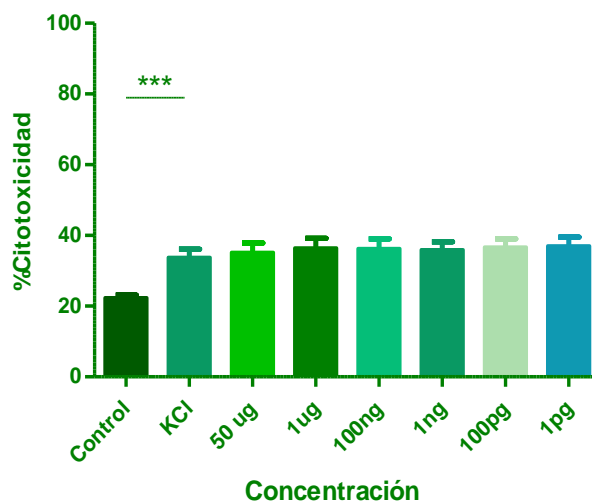


Figura 3-13. Propóleo verde de Brasil al 96% en combinación con 25 μ M de KCl. Las células fueron expuestas a de 25 μ M de KCl, y 24 h después se adicionaron concentraciones crecientes de propóleo. 24h después, se evaluó la muerte celular con el método de cuantificación de la enzima LDH. Los datos se presentan como la media \pm SEM de 4 experimento independientes. $p \geq 0.05$ vs control de muerte (Control KCl).

Figura 3-14. Comparación de SHSY-5Y expuestas a 25mM de KCl junto con propóleos 104, 146 o Propóleo Verde de Brasil.

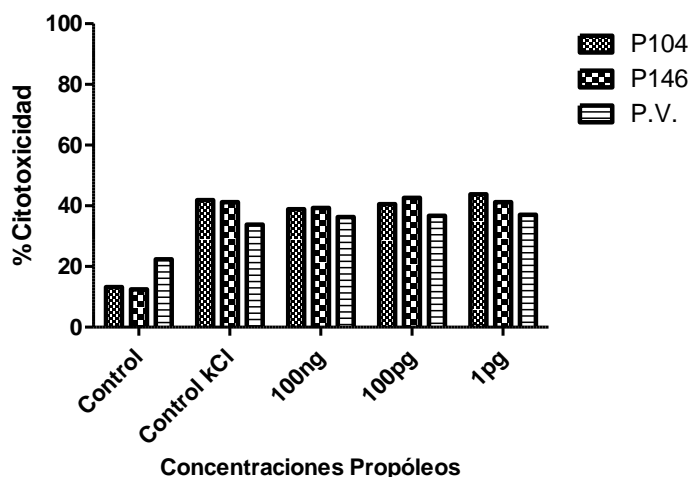


Figura 3-14. Células SHSY-5Y expuestas a concentraciones crecientes de los propóleos Cundiboyacenses 104, 146, y propóleo verde de Brasil. 24h después, se evaluó la muerte celular con el método de cuantificación de la enzima LDH. Los datos se presentan como la media \pm SEM de 4 experimento independientes. $p \geq 0.05$ vs control de muerte (Control KCl).

Bibliografía

1. García S, Sauri T, Meza E, Lucino J. Perspectiva histórica y aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Parkinson. *Med Int Mex*. 2008;24(1):28-37.
2. Gallego D, Rojas M, Orozco C. Free Radicals, neuronal death and neuroprotection. En: Raymond Chuen-Chung Chang, editors. *Neurodegenerative Diseases. Processes, Prevention, Protection and Monitoring*. InTech; 2011. Disponible en: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/free-radicals-neuronal-death-and-neuroprotection>.
3. Hy LX, Keller DM. Prevalence of AD among whites: A summary by levels of severity. *Neurology* 2000;55:198-204.
4. Kannappan R, Chandra S, Kim J, Reuter S, Bhushan B. Neuroprotection by spice-derived nutraceuticals: You Are What You Eat!. *Mol Neurobiol*. 2011;44(2):142-59.
5. Melo A, Monteiro L, Rute MF, Lima R, de Oliveira D, de Cerqueira D, et.al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2011:1-14. doi: 10.1155/2011/467180. Article ID 467180. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/oximed/2011/467180/>.
6. Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2003;348:1356-64.
7. Uzun S, Kozumplik O, Folnegovi V. Alzheimer's Dementia: Current Data. *Col Antropol*. 2011;35(4):1333-37.
8. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha M, Spencer J. Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients*. 2010;2:1106-31.
9. Andersen JK: Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. *Nat Med*. 2004;10(Suppl):S18-25.
10. Esiri MM: The interplay between inflammation and neurodegeneration in CNS disease. *J Neuroimmunol*. 2007;184(1-2):4-16.
11. Kopito RR: Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*. 2000;10(12):524-30.
12. Martinez M, Cuervo AM: Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol*. 2007;6(4):352-61.
13. Mattson MP: Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*. 2007;6(3):337-50.

14. Golde T. The therapeutic importance of understanding mechanisms of neuronal cell death in neurodegenerative disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2009;4:8.
15. Martínez C, Rugerio C, Vargas S, Rivas A. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*. 2003;46(6).
16. Shulman L. Gender differences in Parkinson's disease. *Gender Med*. 2007;4(1):8-18.
17. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev*. 2001;81:741-66.
18. García A, Gandia L. Fronteras en la enfermedad de Alzheimer. 1ra ed. Farmaindustria, editor. Madrid; 2002.
19. Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol*. 2009;169(8):919-26.
20. Yu SP, Canzoniero LM, Choi DW. Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13:405-11.
21. Orozco C, García A, Arias E, Hernández J. Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *Eur J Physiol*. 2006;553: 28–38.
22. Butterfield D. Amyloid beta-peptide (1-42) induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. *Free Radic Res*. 2002;36:1307-13.
23. Maillet M. Manual de biología molecular. 1ra ed. Masson, editor. Barcelona: Fotoletra; 2002.
24. Arboleda G, Matheus L. Muerte celular. Blanco terapéutico en neurodegeneración y sepsis. *Rev Cienc Salud*. 2005;3(2):186-205.
25. Jellinger K. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm*. 2009;116:1111-62.
26. Peinado MA, Herreros ML, del Moral FJ, Martínez E, Siles E, Jiménez A, et.al. Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Rev Neurol*. 2000;31(11):1054-65.
27. Sattler R, y Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med*. 2000;78:3-13.
28. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid-beta protein toxicity. *Cell*. 1994;77:817–27.

29. González ME, Castellano O& González M. (1999). Estrés oxidativo en las neurodegeneraciones. *Rev Neurol.* 1999;28(5);504-11.
30. Ben-Schachar D, Youdim MBH. Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical "parkinsonism" in rats. *J Neurochem.* 1991;57:2133-35.
31. Jenner P, Warren C. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology.* 1996;47:161-170.
32. Sengstock GJ, Olanow CW, Menzies RA, Dunn AJ, Arendash GW. Infusion of iron into the rat substantia nigra: nigral pathology and dose-dependent loss of striatal dopaminergic markers. *J Neurosci Res.* 1993;35:67-82.
33. Sofic E, Paulus W, Jellinger K, Riederer P, Youdim MBH. Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J Neurochem.* 1991;56:978-982.
34. Adams JD Jr, Odunze IN. Biochemical mechanisms of l-methyl-4-phenyl-l,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Biochem Pharmacol.* 1991;41:1099-105.
35. Jenner P, Marsden CD. MPTP-induced parkinsonism: a model of Parkinson's disease and its relevance to the disease process. In: Marsden CD, Fahn S, eds. *Movement disorders, neurology 2.* London: Butterworth Scientific; 1981.
36. Singer TP, Castagnoli N, Ramsay RR, Trevor AJ. Biochemical events in the development of parkinsonism induced by l-methyl-4-phenyl-l,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem.* 1987;49:1-8.
37. Jacotot E, Costantini P, Laboureaux E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;887:1830.
38. Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal.* 1999;11: 7785.
39. Mills LR. The sodium calcium exchanger and glutamate induced calcium loads in aged hippocampal neurons *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;15:37990.
40. Paschen W, Douthett J. Disturbance of endoplasmic reticulum functions: a key mechanism underlying cell damage? *Acta Neurochir Suppl.* 1999;73:15.
41. Rustin P, von Kleist-Retzow J, Vajo Z, Rotig A, Munnich A. For debate: defective mitochondria, free radicals, cell death, aging reality or mitochondria? *Mech Aging Dev.* 2000;114:2016.
42. Sugrue MM, Wang Y, Rideout HJ, Chalmers RM, Tatton WG. Reduced mitochondrial membranes potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p53-induced senescence. *Biochem Biophys Commun.* 1999;261:2330.

-
43. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacol.* 2001;40(8):959-75.
44. Uttara B, Singh A, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(1):65-74.
45. Shimazawa M, Chikamatsu S, Morimoto N, Mishima S, Nagai H, Hara H. Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against *In vitro* and *In vivo* Ischemic Neuronal Damage. *Ecam* 2005;2(2):201-07.
46. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002;73(1):S1–S6.
47. Bankova V, Marcucci MC, Simova S, Nikolova N, Kujumgiev A. Anti-bacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Z Naturforsch.* 1996;51:277-80.
48. Mizoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leuko Essent Fatty Acids.* 1996;55:441–9.
49. Krol W, Czuba Z, Scheller S, Gabrys J, Grabiec S, Shani J. Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminal. *Biochem Int.* 1990;21:593-97.
50. Chen CN, Weng MS, Wu CL, Lin JK. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *eCAM.* 2004;1:175-85
51. Aga H, Shibuya T, Sugimoto T, Kurimoto M, Nakajima SH. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994;58:945-46.
52. Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch.* 1995;50:167-72.
53. Isla MI, Nieva MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol.* 2001;76:165-70.
54. Natarajan K, Singh S, Burkner TR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:9090-95.
55. Calabrese V, Cornelius C, Trovato-Salinaro A, Cambria M, Locascio MS, Di Rienzo L, Condorelli DF, Mancuso C, De Lorenzo A, Calabrese EJ. The hormetic role of dietary antioxidants in free radical-related diseases. *Curr Pharm Des.* 2010;16:877-83.

56. Mandel S, Youdim MB. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:304-17.
57. Scalbert A, Johnson IT & Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:215-17.
58. Mandel S, Grunblatt E, Riederer P, Gerlach M, Levites Y, Youdim M. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease an update on progress. *CNS Drugs*. 2003;17(10):729-62.
59. Ebrahimi A, Schluesener H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. *Ageing Res Rev*. 2012;11:329-45.
60. Queen B, Tollefsbol T. Polyphenols and Aging. *Curr Aging Sci*. 2010;3(1):34-42.
61. Bruschi ML, Lara EHG, Martins CHG, Vinholis AHC, Casemiro LA, Panzeri H, et.al. Preparation and Antimicrobial Activity of Gelatin Microparticles Containing Propolis Against Oral Pathogens. *Drug Dev Ind Pharm*. 2006;32(2):229-38.
62. Schüle B, Reijo RA, Langston W. Can cellular models revolutionize drug discovery in Parkinson's disease?. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792:1043-51.
63. Kölsch H, Lütjohann D, Tulke A, Björkhem I, Rao M. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Bra Res*. 1999;188(1):171-75.
64. Li Y, Bushnell A, Lee C, Perlmutter L, Wong S. β -Amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Bra Res*. 1996;738(2):196-204.
65. Hara H, Ohta M, Ohta K, Kuno S, Adachi T. Increase of antioxidative potential by tert-butylhydroquinone protects against cell death associated with 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res Mol*. 2003;119(2):125-31.
66. Jin W, Lo TM, Loh HH, Thayer SA. U73122 inhibits phospholipase C-dependent calcium mobilization in neuronal cells. *Brain Res*. 1994;642:237-43.
67. Roberts DJ, Khan N, McDonald RL, Webster NJ, Peers C, Vaughan P. Inhibition of depolarisation-evoked [H]noradrenaline release from SH-SY5Y human neuroblastoma cells by muscarinic (M1) receptors is not mediated by changes in [Ca]²⁺. *Mol Bra Res*. 2001;87:81-91.
68. Rodríguez J, Ortega V, Cantera M. Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad *in vitro* de líneas de melanoma. *Patología* 1997. 30(1):18-27.

-
69. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
70. Almaguer D, Almaguer LE. Estrés oxidativo y muerte neuronal. Una visión biomolecular. *Rev Mex Neuroci*. 2006;7(4):330-37.
71. Avik R, Pahan K. Prospects of Statins in Parkinson Disease. *Neuroscientist*. 2011;17(3):244-55.
72. Butterfield A, Perluigi M, Sultana R. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: New insights from redox proteomics. *Eur J Pharmacol*. 2006;545:39–50.
73. Contestabile A. Oxidative Stress in Neurodegeneration: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Curr Top Med Chem*. 2001;1(6):553-68.
74. Gandhi S, Abramov A. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2012 Mar:1-11. doi:10.1155/2012/428010. Article ID 428010. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/oximed/2012/428010/>
75. Murakami K, Shimizu T, Irie K. Formation of the 42-mer Amyloid β radical and the therapeutic role of superoxide dismutase in Alzheimer's disease. *Journal of Amino Acids* [Internet]. 2011, 1-10. doi: 10.4061/2011/654207. Article ID 654207, 10 pages. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/jaa/2011/654207/>
76. Navarro A, Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*. 2010;2(34):1-11.
77. Tabner BJ, Turnbull S, El-Agnaf O, Allsop D. Production of Reactive Oxygen Species from Aggregating Proteins Implicated in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *Curr Top Med Chem*. 2001;1:507-17.
78. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an *in vitro* and in vivo antioxidant. *Ann N Y Acad Sci*. 1989;570:17-22.
79. Burton GW, Ingold KU. Mechanisms of antioxidant action: preventive and chain-breaking antioxidants. En: Miguel A, Quintanilha AT, Weber H., editores. *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*; FL 1990.
80. Dreosti I, Meydani M, Joseph J. How best to ensure daily intake of antioxidants (from the diet and supplements) that is optimal for life span, disease, and general health. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;854:463-76.
81. Kelsey N, Wilkins H, Linseman D. Nutraceutical Antioxidants as Novel Neuroprotective Agents. *Molecules*. 2010;15:7792-814
82. Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, et.al. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol*. 1993;45:13-19.

83. Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med*. 1996;21:895-902.
84. Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol*. 2006;545:51-64.
85. Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ, Buford JP, et al. Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;99:12197-202.
86. Youdim KA, Joseph JA. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: A multiplicity of effects. *Free Radic Biol Med*. 2001;30:583-94.
87. Mahmoud L. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2006;7:22-31.
88. Salamanca G, Correa I, Principal J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Trop*. 2007;25(2):95-102.
89. Cano M, Villarroja M, García A, Gabilán M, López N. Contribution of calcium entry through L-type calcium channels to chromaffin cell death. *An NY Acad Sci*. 2002;971:171-73.
90. Brustovetsky N, LaFrance R, Purl KJ, Brustovetsky T, Keene CD, Low WC, et.al. Age-dependent changes in the calcium sensitivity of striatal mitochondria in mouse models of Huntington's disease. *J Neurochem*. 2005;93:1361-70.
91. Brannon L, Trygve O. Polyphenols and aging. *Curr Aging Sci*. 2010;3(1):34–42.
92. Annunziato L, Amoroso S, Pannaccione A, Cataldi M, Pignataro G, D'Alessio A, et.al. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol Lett*. 2003;139(2-3):125-33.
93. Starkov AA, Polster BM, Fiskum G. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J Neurochem*. 2002;83:220-28.

Conclusiones y Recomendaciones

Discusión y Conclusiones

Teniendo en cuenta los reportes previos sobre la capacidad antioxidante de los propóleos (dada en parte por el contenido de polifenoles) y los resultados del presente estudio que indicaron una clara ausencia de efecto protector de los propóleos colombianos y de la muestra de propóleo verde de Brasil, se podrían enumerar y describir algunos factores que podrían afectar de manera directa o indirecta, la posible capacidad neuroprotectora de las muestras consideradas en este estudio: i) tipos y concentraciones de polifenoles que componen las diferentes muestras; ii) forma de procesamiento y refinamiento de las muestras; y iii) características del modelo celular de experimentación.

i) Tipo de polifenoles: De acuerdo con algunos autores, la capacidad de los polifenoles para actuar como antioxidantes está dada por su habilidad de quelar iones metálicos, con lo que se logra sofocar las especies reactivas que contribuyen al daño oxidativo [20]. No obstante, esta capacidad antioxidante depende de la estructura molecular de cada polifenol, la posición de grupos hidroxilo, y otras sustituciones en su estructura química [21]. Los principales polifenoles reportados en propóleos son los flavonoides, derivados de ésteres y ácidos fenólicos [22], y las concentraciones de este tipo de sustancias en cada muestra de propóleo difieren en función de la variedad de abejas, el clima, la flora y el dispositivo de recogida [23, 24].

Algunos autores reportaron que los flavonoides totales de muestras de propóleos obtenidos principalmente de Boyacá, se encontraron en un rango entre 5,30% (Santa Rosa) y 22,3% (Cucaita), y fueron comparables con muestras de propóleos de origen

Argentino. Sin embargo, los resultados observados, mostraron diferencias significativas entre las muestras, variaciones que fueron determinadas en función del origen biogeográfico y que se expresaron a través del contenido de flavonoides totales con diferentes tiempos de oxidación [22].

En este sentido, sería válido inferir que los propóleos seleccionados para nuestro estudio, podrían representar zonas colombianas donde la variedad botánica provee a los propóleos de algún tipo de flavonoides que al parecer no poseen una marcada actividad neuroprotectora [23, 25].

ii) Forma de procesamiento y refinamiento de las muestras: Durante el proceso de recolección, transporte y almacenamiento en la colmena, las abejas adicionan a los propóleos, cera, enzimas y secreciones glandulares de la hipofaringe y glándulas cereras presentes en los esternitos del abdomen. Adicionalmente, puede añadir microelementos del entorno, donde el producto final es de consistencia viscosa, con tonalidades de color castaño, marrón, pardo, rojizo y verde, en algunos casos negro, según sea el origen botánico y geográfico [22, 26]. En este sentido, cada muestra de propóleo, no solo puede depender de la diversidad botánica de cada región, sino además, del macroambiente donde se encuentre la colmena.

Por otro lado, la recolección y procesamiento de las muestras por parte de los operarios, también podría ser considerado como un factor capaz de aumentar la variabilidad composicional de cada propóleo. Es decir, la manipulación directa de muestras, el contacto de los propóleos con superficies contaminadas, la exposición de muestras a ambientes extremos, o incluso, algunas técnicas de recolección, procesamiento, y almacenamiento, podrían generar alteraciones en los aspectos químicos, físicos o composicionales. La validez de esta consideración puede ser sustentada en reportes previos que consideran al propóleo como un producto delicado, que debe ser conservado en bolsas de polietileno, y que se conserva mejor congelado, o a temperatura ambiente de 15°C, para así, evitar la contaminación con hongos u otros contaminantes [27]. En este sentido, es válido sugerir que la calidad de los propóleos puede verse afectada en aspectos como el pH, lo que puede modificar algunas estructuras moleculares de las muestras, haciendo que sus propiedades protectoras, puedan verse disminuida en cierta medida. Por lo tanto, es necesario plantear estudios que confirmen la participación de las técnicas de procesamiento de las muestras de propóleo, en una posible alteración de las propiedades reales de los propóleos procesados.

iii) Características del modelo celular de experimentación: Existen varios modelos de evaluación de neuroprotección *in vitro*, y uno de estos métodos incluye el uso de líneas celulares. En nuestro estudio se empleó la línea celular SHSY-5Y, la cual ha sido ampliamente utilizada en estudios de EN como la EA y la EP, ya que se comporta como una fuente ilimitada de células humanas con características bioquímicas similares a las encontradas en neuronas humanas dopaminérgicas [28]. No obstante, es importante considerar algunas limitaciones asociadas al uso de células SHSY-5Y indiferenciadas: a) existe una continua mitosis que provoca un incremento de la población celular a pesar de los tratamientos, lo que podría dificultar la caracterización certera de los efectos que poseen diferentes sustancias citotóxicas o neuroprotectoras, sobre las tasas de proliferación o muerte celular [29]; b) la línea celular SH-SY5Y es un cultivo asincrónico y no siempre exhibe los mismos marcadores de neuronas maduras [30]. Por ejemplo, las células indiferenciadas expresan actividad dopamina β -hidroxilasa, sin embargo, la síntesis de catecolaminas (Adrenalina y Noradrenalina), puede estar limitada por la deficiencia de la actividad dihidroxifenilalanina decarboxilasa [31]. Además, no expresan algunos marcadores de células diferenciadas como Noradrenalina, Proteína Asociada al Crecimiento (GAP-43), receptores de factores neurotróficos, proteína Nuclear Neuronal (NeuN), proteínas vesiculares como sinaptofisina, y proteínas asociadas al citoesqueleto, específicas del tejido neuronal, incluyendo las Proteínas Asociadas a Microtúbulos (MAPs), proteína Tau y proteínas de neurofilamentos [32, 33].

Las proteínas MAP, GAP-43, NeuN, y la sinaptofisina, son marcadores clásicos de neuronas maduras, no obstante, aún no se conoce si las células SHSY-5Y diferenciadas, realicen las mismas funciones que las neuronas maduras *in vivo* [28].

Estas características de los cultivos SHSY-5Y indiferenciados, podrían enmascarar de manera parcial, posibles diferencias significativas entre los controles de muerte por KCl y H_2O_2 y los tratamientos con propóleos colombianos, ya que la continua mitosis y/o la asincronía de los cultivos celulares indiferenciados, podrían favorecer la densidad celular de los controles de muerte, y además, la ausencia de algunos marcadores neuronales podrían limitar en cierta medida, las respuestas celulares frente a la acción antioxidante de los propóleos evaluados en nuestro trabajo.

En conclusión, los resultados de nuestra investigación indicaron una ausencia de efecto neuroprotector de propóleos Colombianos en células SHSY-5Y indiferenciadas y

expuestas a H_2O_2 y KCl, por lo tanto es necesario utilizar otro tipo de modelos neuronales para observar si existen variaciones en cuanto a la respuesta celular frente a la acción de los propóleos Colombianos.

Recomendaciones

Debido a que la reconocida capacidad antioxidante de los propóleos depende de las condiciones biogeográficas de su lugar de origen, la amplia variedad de propóleos Colombianos puede incluir algunas muestras que presenten una capacidad neuroprotectora, por lo tanto, se hace necesario profundizar en el conocimiento de las características específicas de los propóleos obtenidos de las diferentes regiones geográficas del país.

El uso de propóleos colombianos como agentes nutraceuticos, podría favorecer las respuestas celulares *in vivo*, ante las alteraciones asociadas al desarrollo de EN como la EA y la EP.

La mínima expresión de recuperación de la viabilidad observada con algunas muestras en este estudio, plantea la necesidad de realizar estudios adicionales que expliquen los efectos del propóleo sobre la integridad de células neuronales expuestas a KCl. una posible

Es importante considerar que una variedad más amplia de regiones geográficas del territorio nacional, podrían ser consideradas en futuras investigaciones.

A pesar de no haber observado capacidad neuroprotectora en nuestro modelo de estudio, no se descarta la posibilidad de que en otros modelos *in vitro* de EA y de EP, puedan ser observados algunos efectos neuroprotectores.

Anexo A: Síntomas y lesiones de la Enfermedad de Alzheimer.

Síntomas Típicos

- I. Dificultad Progresiva para recordar hechos recientes y para adquirir datos nuevos datos.
- II. Cambio de personalidad y de la manera de ser y estar.
- III. Disminución del lenguaje, se hace dubitativo.
- IV. Desorientación en lugares no familiares.

Síntomas atípicos

- I. Inicio o curso rápido.
- II. Síntomas neurológicos o neuropsicológicos “focales”.

Lesiones

- Pérdida sináptica y neuronal.
- Placas difusas y neurítica.
- Ovillos neurofibrilares con filamentos helicoidales emparejados.
- Neuritas distróficas.
- Microangiopatía amiloide.
- Atrofia cortical.

Anexo A. Síntomas y lesiones característicos de la EA. Tomado de Fronteras de la Enfermedad de Alzheimer. Ed. Farmaindustria, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, 2002.

Anexo B: Factores asociados a la Enfermedad de Alzheimer.

GENÉTICOS	DEMOGRAFICOS	MEDICOS
APOEε4	Edad avanzada	Depresión
Trisomía 21	Nacionalidad	Menopausia, andropausa
Otros polimorfismos (cromosomas 6,9,10 y 12)	Cociente Intelectual	Hipertensión arterial
Historia Familiar	Nivel Educativo	Hipercolesterolemia
Sexo Femenino	Dieta sin antioxidantes	Deficiencia vitaminas B
Etnia		Obesidad
		Tabaquismo

Factores de riesgo asociados a EA. Tomado de Fronteras de la Enfermedad de Alzheimer. Ed. Farmaindustria, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, 2002.

GENÉTICOS	DEMOGRAFICOS	MEDICOS
APOEε2	Nacionalidad	Menarquía
Otros polimorfismos	Cociente Intelectual	Hormonas sexuales
Factores de riesgo cardiovascular, genéticos y ambientales	Nivel Educativo	Normalidad de tensión arterial,
Gerontogenes	Dieta sin antioxidantes	colesterolemia,
	Etanol	homocisteinemia, B12 y folatos

Factores protectores asociados a EA. Tomado de Fronteras de la Enfermedad de Alzheimer. Ed. Farmaindustria, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, 2002.

Bibliografía

1. Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas, DANE [Internet]. Bogotá: Censo General 2005 Republica de Colombia Población adulta mayor 2005 [actualizado 2005 Julio]. Disponible en: <http://www.dane.gov.co/censo/files/presentaciones/centenario.pdf>.
2. Herrera M, Hernández-Aguilar ME, Manzo J, Emiliano G, Abre A. Enfermedad de Alzheimer: inmunidad y diagnóstico. *Rev. Neurol.* 2010;51:153-16.
3. Melo A, Monteiro L, Lima RM, de Oliveira DM, de Cerqueira MD, El-Bachá RS; Hindawi Publishing Corporation. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxid Med Cell Longev.* 2011, Article ID 467180, 14 pages.
4. Troen BR. The biology of ageing. *Mt Sinai J Med.* 2003;70:3-22.
5. Chen J. Parkinson's disease: Health-Related Quality of Life, Economic Cost, and Implications of Early Treatment. *Am J Manag Care.* 2010;16(4) Suppl Implications:S87-93.
6. Gallego D, Figueroa J, Orozco C. Síndrome de disfunción cognitiva de perros geriátricos. *Rev. MVZ Córdoba* 2010;15(3):2252-2262.
7. Pérez J. El Síndrome de disfunción cognitiva en el perro. *Rec Vet.* 2007;2(1-4):1-9.
8. Gallego D, Figueroa J, Orozco C. Síndrome de disfunción cognitiva del perro como modelo de investigación de las enfermedades neurodegenerativas del humano. *Rev Fac Med* 2010;58(2):142-154.
9. Gallego D, Rojas M, Orozco C. Free Radicals, Neuronal Death and Neuroprotection. En: Raymond Chuen-Chung Chang, editors. *Neurodegenerative Diseases. Processes, Prevention, Protection and Monitoring.* XXX InTech; 2011. Disponible en: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/free-radicals-neuronal-death-and-neuroprotection>.
10. González M, Castellano O, González M. Estrés oxidativo en las neurodegeneraciones. *Rev Neurol.* 1999;28(5):504-11.
11. Navarro A, Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci.* 2010;2(34):1-11.
12. Balenahalli N, Ramesh TS, Sathyanarayana R, Annamalai P, KumarS, Jagannatha Rao. Neuronutrition and Alzheimer's Disease. *Alzheimers Dis.* 2010;19(4): 1123-39.
13. Casetta V, Granieri E. Oxidative Stress, Antioxidants and Neurodegenerative Diseases. *Curr Pharmaceut Design.* 2005;11:2033-52.

14. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacol.* 2001;40(8): 959-75.
15. Kamphuisa P, Scheltensb P. Can Nutrients Prevent or Delay Onset of Alzheimer's Disease?. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(3):765–75.
16. Uttara B, Singh A, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7:65-74.
17. Shimazawa M, Chikamatsu S, Morimoto N, Mishima S, Nagai H, Hara H. Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against *In vitro* and *In vivo* Ischemic Neuronal Damage. *Ecam* 2005;2(2):201-07.
18. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.* 1999;64(3):235–240.
19. Banskota A, Tezuka Y, Kadota S. Recent Progress in pharmacological Research of Propolis. *Phytother Res.* 2001;15:561–71.
20. Brannon L, Trygve O. Polyphenols and Aging. *Curr Aging Sci.* 2010;3(1):34-42.
21. Sun A, Wang Q, Simonyi A, Sun G. Botanical phenolics and brain health. *Neuromol Med.* 2008;10(4):259-74.
22. Salamanca G, Correa I, Principal J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Trop.* 2007;25(2):95-102.
23. Farré R, Frasquet I, Sánchez A. El propólis y la salud. *Ars pharmaceutica.* 2004;45(1):21-43.
24. Martínez A. Diagnóstico de la actividad apícola y de la crianza de abejas en Colombia. Ministerios de Agricultura y desarrollo rural, Instituto interamericano de cooperación para la agricultura IICA, 2006. Disponible en: http://www.agronet.gov.co/www/docs_apicola/2008225164047_Diagnostico%20gral%20Cadena%20Abejas%20y%20Apicultura.pdf
25. Magrone T, Marzulli G, Jirillo E. Immunopathogenesis of neurodegenerative diseases: current therapeutic models of neuroprotection with special reference to natural products. *Curr Pharm Des.* 2012;18(1):34-42.
26. Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamed M, Ahmadkhaniha R, Samadi N, Nasser Ostad S. Chemical composition, oral toxicity and microbialactivity of Iranian propolis. *Food Chem.* 2007;103:1097-103.

27. Manrique AJ. Producción de propóleo. Foniap Divulga. 2000 Abr-Ago;102(6). Disponible en: http://sian.inia.gov.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd66/texto/propoleo.htm
28. Xie H, Hu L, Li G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Chin Med J. 2010;123(8):1086-92.
29. Datki Z, Juhász A, Gálfi M, Soós K, Papp R, Zádori D, et al. Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells. Brain Res Bull. 2003;62:223-29.
30. Xie H, Hu L, Li G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Chin Med J. 2010;123(8):1086-92.
31. Ikeda H, Pastuszko A, Ikegaki N, Kennett RH, Wilson DF. 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) metabolism and retinoic acid induced differentiation in human neuroblastoma. Neurochem Res. 1994;19:1487-94.
32. Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in neurotoxicity research. Neurotoxicology. 2009;30:127-35.
33. Gimenez-Cassina A, Lim F, Diaz-Nido J. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. J Neurosci Res. 2006;84:755-767.
- .